

Helsingin yliopisto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos
Kotieläinten lisääntymistiede

Kiimansynkronointiohjelmat naudalla

GnRH:n ajoitus prostaglandiini-injektioon nähden ja lyhyiden kiimakiertojen esiintyminen

Mira J. Tenhunen

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma
Helsinki 2008

SISÄLLYS

Tiivistelmä

I Kirjallisuuskatsaus	3
1 Johdanto	3
2 Miksi synkronoida kiimoja?	3
3 Naudan lisääntymiseen liittyviä hormoneita	5
3.1 Keltarauhanen ja progesteroni sekä luteolyysi	5
3.2 PGF _{2α}	6
3.3 GnRH	8
4 Kiimansynkronointiohjelmiä	10
4.1 PGF _{2α} -menetelmiä	10
4.1.1 Kaksi PGF _{2α} -injektiota	12
4.1.2 Maanantaiaamuohjelma	13
4.1.3 Targeteg Breeding Program™	14
4.1.4 Ajoitettu siemennys PGF _{2α} -ohjelmissä	14
4.2 GnRH ja PGF _{2α}	16
4.2.1 Ovsynch	17
4.2.2 CoSynch, GnRH:n ajoituksen merkitys ja lyhyet kiimakierrot	21
4.2.3 Heatsynch	23
4.2.4 Selectsynch	24
4.2.5 Esisynkronointi, Presynch	25
4.2.6 Uudelleen synkronointi, Resynch	27
4.3 Progesteronin käyttö kiimansynkronoinnissa	28
4.3.1 Modifioitu Ovsynch	30
4.4 Muita menetelmiä	31
II Tutkimusosa	33
1 Johdanto	33
2 Aineisto ja menetelmät	34
2.1 Eläimet	34
2.2 Tutkimusasetelma	34
2.3 Tutkimusmenetelmät	35
2.4 Tilastollinen käsittely	35
3 Tulokset	36
3.1 Reagoimattomuus hormonikäsittelyihin	36
3.2 Sykliäen pituus	36
3.3 Ovulaatioajankohta ja follikkelin koko ovulaatiohetkellä	37
3.4 Progesteronipitoisuudet	37
4 Pohdinta	39
Kiitokset	40
Kirjallisuus	41

I Kirjallisuuskatsaus

1 JOHDANTO

Viime vuosikymmeninä maitotuotos on kasvanut ja tiinehtyminen heikentynyt (Chebel ym. 2004). Osittain tämä johtuu kiimantarkkailun tehottomuudesta karjakoon kasvaessa. Tutkijat ovat kehittäneet erilaisia hormonipohjaisia ohjelmia, joilla ovulaatio saataisiin ajoitettua niin tarkasti, että voitaisiin tehdä pelkästään ajoitettuja siemennyksiä, jolloin vaivalloinen kiimantarkkailu tulisi tarpeettomaksi. Ensimmäiset synkronointimenetelmät perustuivat eri intervaleihin annettuihin PGF_{2α}-injektioihin, myöhemmin menetelmiin on otettu mukaan GnRH. Lisäksi menetelmissä on käytetty muun muassa progesteronia ja estrogeenianalogeja.

2 MIKSI SYNKRONOIDA KIIMOJA?

Kiimantarkkailun tehottomuus vähentää karjatalouden tulosta USA:ssa yli 300 miljoonaa dollaria joka vuosi. Uusia menetelmiä on kehitetty korvaamaan ja tukemaan visuaalista tarkkailua. Näiden menetelmien pitää pystyä toimimaan vuorokauden ympäri, olla tarkkoja ja vähentää työvoimatarve minimiin. Menetelmien kiimanhavainnointitarkkuudessa tulisi päästä yli 95 %:iin. Myös kiimassa oleva eläinyksilö pitäisi pystyä erottamaan muusta ryhmästä. Nykyisiä menetelmiä ovat podometri, joka mittaa liikkeen määrää, emättimen limakalvon sähkövastuksen muutoksia mittaava laite ja laitteet, jotka rekisteröivät seisomisreaktiota kiimahyppyjen yhteydessä. USA:ssa alle puolet kiimoista havaitaan ja kolmannes siemennyksistä tapahtuu kiiman ulkopuolella. Kun karjakoko kasvaa, jää kiimantarkkailulle entistä vähemmän aikaa (Senger 1994).

Keinosiemennys mahdollistaa geneettisesti parhaiden mahdollisten urosten käytön, jolloin perinnöllinen edistyminen muun muassa tuotanto-ominaisuuksissa tehostuu. Kiimantarkkailu ja siemennyksen ajoittaminen ovat keskeisimpiä rajoittavia tekijöitä lypsykarjan lisääntymistehokkuudessa. Ongelmaa helpottamaan on kehitetty useita kiimansynkronointiohjelmia, jotka luovat vaihtoehdon kiimantarkkailulle. Tavoitteena on kontrolloida kiiman alkamisaikaa ja synkronoida ovulaation ajankohta niin tarkasti, että mahdollisimman suuri osa eläimistä saadaan siemennettyä haluttuna ajankohtana. Toivottavaa on lisäksi säilyttää normaali hedelmällisyys synkronoidussa ja myöhemmissä kiimoissa (Larson & Ball 1992).

Ensimmäinen kiimansynkronointimenetelmä oli manuaalinen keltarauhasen puristaminen rektaalisesti, mikä aiheutti myöhemmin kiiman. Nykyisistä luteolyyteistä tehokkaimpia ovat prostaglandiini $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ja sen agonistiset analogit. Pelkällä luteolyyysillä ei kuitenkaan saada aikaan kovin tehokasta synkronisaatiota. Tehokkuutta lisäävät esimerkiksi maidon progesteronipitoisuuden määrittäminen, kiimantarkkailu ja rektaalitutkimukset. Nämä kaikki lisäävät myös kustannuksia ja synkronointiohjelmien monimutkaisuutta. Myös progesteronihoitoja on käytetty kiimansynkronoinnissa. Ne eivät kuitenkaan yksistään ole kovin tehokkaita, vaan vaativat yhdistämistä toisen hormonin, yleensä prostaglandiinin tai estradiolin kanssa. Nämä menetelmät käyvät hyvin myös eläimille, joilla ei ole kiimakierto käynnissä (Larson & Ball 1992).

Suurimmat lisääntymiseen liittyvät taloudellista tuotosta heikentävät tekijät ovat eläinten poisto karjasta tiinehtymättömyyden vuoksi sekä siemennyskauden venyminen. Joissain karjoissa on Ovsynch-kiimansynkronointiprotokollan avulla siemennyskautta ja tyhjäkautta saatu lyhenemään. Joissakin karjoissa myös poistot steriliteetin vuoksi saattavat vähetä. Karjoittain on suuria eroja siemennysten onnistumisessa. Vaikka synkronointiohjelmat parantavatkin yleisesti tiineytystulosta, eivät ne välttämättä ole taloudellisesti kannattavia ainakaan karjoissa, joissa kiimantarkkailu toimii. Kustannuksia tulee siemennyksistä, lääkityksistä, työvoimasta ja tutkimuksista (Tenhagen ym. 2004). Vaikka kiimantarkkailusta luopuminen houkuttelee monia karjanomistajia, on kuitenkin hyvä laskea karjakohtaisesti, tuovatko käytetyt menetelmät etua, sillä lääkkeet ja työvoima maksavat (Rabiee ym. 2005).

3 NAUDAN LISÄÄNTYMISEEN LIITTYVIÄ HORMONEJA

3.1 Keltarauhanen ja progesteroni sekä luteolyysi

Naudan kiimakierro kestää noin 21 vuorokautta, ja se jaetaan neljään osaan: estrukseen, metestrukseen, diestrukseen ja proestrukseen. Diestrusvaiheessa keltarauhanen tuottaa progesteronia, joka tarvittaessa ylläpitää alkanutta tiineyttä. Mikäli tiineyttä ei tunnisteta, tuottaa kohtu prostaglandiinia, mikä aikaansaa keltarauhasen surkastumisen. Samaan aikaan on follikkeliaallossa valikoitunut dominoiva follikkeli, joka kypsyy ja lopulta ovuloi.

Ovulaation jälkeen ovulaatiokohtaan muodostuu corpus hemorrhagicum (CH). Se tuottaa jo jonkin verran progesteronia. Tätä vaihetta kutsutaan metestrukseksi. Noin viikon kuluttua ovulaatiosta CH järjestäytyy keltarauhaseksi ja progesteronin tuotanto muuttuu tasaisemmaksi. Tällöin puhutaan diestrusvaiheesta. Keskimäärin 17–18 päivää ovulaation jälkeen keltarauhanen surkastuu, jolloin alkaa proestrus (Seguin 1997).

Looper ym. (2003) totesivat, että ensimmäisen poikimisen jälkeen havaitun kiiman jälkeen 72 %:lla emolehmistä oli normaali luteaalivaihe (yli 11 vuorokautta kestävä >0,5 ng/ml progesteronipitoisuus), 16 %:lla oli lyhyt luteaalivaihe ja 12 %:lta se puuttui kokonaan. Niillä eläimillä, joilla oli normaalipituinen kierto, oli korkeimmat maksimiprogesteronipitoisuudet.

Luteolyysiin vaikuttavat keltarauhasen progesteroni, oksitosiini ja endometrium tuottama $\text{PGF}_{2\alpha}$. Isot luteaalisolut keltarauhasessa tuottavat oksitosiinia ja varastoivat sitä granuloihin. Kohdun pitää olla altistunut progesteronille riittävän pitkään, jotta se pystyy vapauttamaan prostaglandiinia. Kierron loppua lähestyttäessä endometrium tuottamien prostaglandiinipulssien amplitudi ja frekvenssi kasvavat. Jotta keltarauhanen tuhoutuisi, pitää $\text{PGF}_{2\alpha}$ -pulsseja tulla tarpeeksi monta tietyn ajan kuluessa. Syklin ensimmäisen puolikkaan aikana progesteroni estää oksitosiinireseptorien toimintaa kohdussa, mikä inhiboi $\text{PGF}_{2\alpha}$:n eritystä. 10–12 vuorokauden kuluttua syklin alusta progesteroni menettää tehonsa, sillä vaikka progesteronin määrä veressä lisääntyy,

vähenevät endometriumien progesteronireseptorit. Tämä mahdollistaa $\text{PGF}_{2\alpha}$ -erityspiikit. Tässä myöhäisessä luteaalivaiheessa eksogeenisellä oksitosiini-injektiolla saadaan aikaan endogeeninen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -pulssi. Toisaalta myös $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektio aiheuttaa endogeenisen oksitosiinipulssin (Senger 2003).

3.2 $\text{PGF}_{2\alpha}$

Kiimakierron säätelyn virstanpylväitä on ollut injisoitavan $\text{PGF}_{2\alpha}$:n tuottaminen. Ilman luteolyysiä ei tule kiimaa, ja $\text{PGF}_{2\alpha}$ on hyvin spesifinen luteolyysi. Muita käytettäviä aineita on esimerkiksi estradioli, joka kuitenkin nykyään on kielletty EU:ssa tuotantoeläimillä. $\text{PGF}_{2\alpha}$ on myös estradiolia tehokkaampi indusoimaan luteolyysiä.

$\text{PGF}_{2\alpha}$ on lyhytikäinen hormoni, jota tuotetaan endometriumissa. Systeemivieressä se tuhoutuu nopeasti, naudan keuhkoverenkierrossa jopa 90-prosenttisesti (Senger 2003). $\text{PGF}_{2\alpha}$:n puoliintumisaika on alle yksi tunti (Hafs ym. 1974). Tämä johtuu siitä, että sen metaboliin puhdistuma on 17 l/min. Maitoon $\text{PGF}_{2\alpha}$:sta erittyy alle 0,003 %. 7 tuntia annostelun jälkeen $\text{PGF}_{2\alpha}$:aa ei löydy maidosta enää lainkaan (Hafs 1976). Sillä on kuitenkin suora reitti utero-ovariaalilaskimosta diffundoitumalla ovarivaltimoon ja sitä kautta munasarjaan, joten se pääsee vaikuttamaan tehokkaasti ennen tuhoutumistaan (Senger 2003). $\text{PGF}_{2\alpha}$:sta ei ole todettu jäävän jäämiä, jotka vaikuttaisivat seuraavissa sykleissä (Hafs ym. 1974).

$\text{PGF}_{2\alpha}$ aiheuttaa keltarauhasen kapillaarien degeneraatiota ja vasokonstriktiota. Tästä huolimatta keltarauhasessa on kuitenkin edelleen muuta munasarjakudosta 5–10 kertaa parempi verenkierto. Kun $\text{PGF}_{2\alpha}$ sitoutuu reseptoriinsa, pääsevät kalsiumionit virtaamaan solun sisään. Tämä laukaisee keltarauhasen soluissa apoptoosin. $\text{PGF}_{2\alpha}$ aktivoi myös proteiinikinaasi C:n, joka inhiboi progesteronin tuotantoa. Plasman progesteronipitoisuuden lasku tapahtuu yhtäaikaaisesti keltarauhasen rakenteen surkastumisen kanssa. Keltarauhasessa on luteolyysin aikaan runsaasti sytokiineja erittäviä makrofageja ja lymfosyyttejä (Senger 2003). Eksogeenisellä $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektiolla saadaan aikaan fysiologisen hormonin kaltainen vaste. Injektion jälkeen muodostuva uusi keltarauhanen elää normaalin eliniän ja erittää normaalin määrän progesteronia (Cooper ym. 1974).

Diestruksessa (10–14 vuorokautta estruksen jälkeen) lihaksensisäisesti annettu $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektio saa aikaan progesteronipitoisuuden vähenemisen 60 %:lla 12 tunnissa ja keltarauhasen pienenemisen (Louis ym. 1973). Progesteronipitoisuus on laskenut basaalitasolle vuorokauden sisällä injektioista. Progesteronitason laskettua follikkelit kasvavat nopeasti ja estradiolia erittyy runsaasti (Dobson ym. 1975). Hafs ym. (1974) mukaan 24 tunnin sisällä intrauteriinisesta annostelusta 70 % keltarauhasen tilavuudesta katoaa. Kiima alkaa keskimäärin 72 tuntia, luteinisoivan hormonin (LH) piikki 71 tuntia ja ovulaatio ajoittuu 95 tuntia annostelun jälkeen. Intramuskulaarisen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektion jälkeen puolestaan kiima alkaa keskimäärin 59 tunnin, luteinisoivan hormonin (LH) huippueritys ajoittuu 64 tunnin ja ovulaatio 87 tunnin kuluttua (Hafs 1976).

LH-piikki kestää yhtä kauan sekä fysiologisesti että $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektion jälkeen (Hafs ym. 1974). Myös sukupuolielinten sekvenssissä sekä LH:n, progesteronin ja estradiolin plasmapitoisuuksissa tapahtuvat muutokset ovat samankaltaisia kuin luonnollisessa estruksessa (Dobson ym. 1975).

Estradioli- 17β -piikki veressä havaitaan noin 48 tuntia $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektion jälkeen (Hafs 1976). Estradiolin nousuun eivät vaikuta injektion aikainen syklin vaihe tai injektioipaikka. $\text{PGF}_{2\alpha}$ -indusoitu estradiolikäyrä muistuttaa luonnollista käyrää, mutta toisin kuin luonnollisessa syklissä, jossa estradioli nousee yhtä aikaa progesteronin laskun kanssa, on progesteronitaso laskenut jo noin 12 tuntia aiemmin (Hafs ym. 1974).

Kiimakierron päivänä kolme (metestrusvaihe) ei millään $\text{PGF}_{2\alpha}$ -annostelutavalla saada luteolyyttistä vaikutusta (Hafs ym. 1974). Annetulla injektioilla ei myöskään ole vaikutusta progesteronipitoisuuksiin eikä keltarauhasen kokoon, mutta Louis ym. (1974) ovat todenneet kiimakierron hitusen lyhentyneen ollen noin 19 vuorokautta.

Kun lehmille annetaan $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektio 0–5 vuorokautta ovulaation jälkeen, keltarauhanen ei vastaa injektioon. Kuudentena vuorokautena 25 %, seitsemäntenä 66 % ja kahdeksantena yli 90 % eläimistä vastaa injektioon. $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektion tulee siis osua syklin päivän 7 tai 8 jälkeiseen aikaan, jotta sillä saavutetaan hyvä luteolyyttinen teho (Seguin 1997).

PGF_{2α} vaikuttaa myös muihin hormoneihin: prolaktiini- ja somatotropiinipitoisuudet kohoavat injektion johdosta, ja 30–60 minuuttia injektion jälkeen havaitaan glukokortikoidipiikki. Kaikki nämä muutokset häviävät neljässä tunnissa. Tyroksiinia stimuloivaan hormoniin tai tyroksiiniin PGF_{2α}:lla ei ole vaikutusta (Hafs 1976).

Annostelutavoista lihaksensisäinen on yleisimmin käytössä, koska se on helpoin toteuttaa ja sen teho on hyvä. Muitakin antotapoja on kokeiltu; intravaginaalisesti lähelle cervixiä annettu prostaglandiini vaikuttaa keskimäärin vuorokauden lihaksensisäistä injektiota hitaammin ja luteolyttisen vasteen ajankohdan vaihtelu on suurempaa (Louis ym. 1973, Hafs ym. 1974, Oxender ym. 1974). 5 mg PGF_{2α}:aa intrauteriinisesti annettuna aiheuttaa samankaltaiset vaikutukset kuin intramuskulaarisesti annettu 30 mg:n annos. Kontralateraaliseen sarveen annosteltuna PGF_{2α} aiheuttaa ipsilateraaliseen verrattuna nopeamman progesteronin laskun, mikä johtunee sarvien välisistä venashunteista sekä kohdun kontraktioista (Hafs ym. 1974).

Kahdella 15 mg:n PGF_{2α}-injektiolla kuuden tunnin välein ja yhdellä 30 mg:n annoksella saavutetaan sama vaste kuin yhdellä 60 mg:n injektiolla. Progesteronin lasku, estradiolin nousu ja LH-piikin kesto sekä kiiman ja ovulaation kesto olivat kaikilla annoksilla samat. Ovulaatio tosin aikaistuu 60 mg:n annoksella keskimäärin 12 tuntia verrattuna muihin annoksiin. Kaikilla lihaksensisäisillä annoksilla veren PGF_{2α}-pitoisuus nousee 10 minuutissa 6 ng/ml:aan ja laskee 90 minuutissa basaalitasolle. Suonensisäisesti annosteltuna 5 mg PGF_{2α}:aa saa veren prostaglandiinipitoisuuden nousemaan viidessä minuutissa 25 ng/ml:aan ja palaamaan basaalitasolle 15 minuutissa (Stellflug ym. 1975).

3.3 GnRH

Gonadotropiineja vapauttavaa hormonia (GnRH) eritetään hypotalamuksesta. Se stimuloi follikkeleja stimuloivan hormonin (FSH) ja LH:n eritystä hypofyysistä. Tooninen GnRH-keskus erittää jatkuvasti pieniä pulsseja GnRH:ta riippumatta kiimakierron vaiheesta. Kun estradiolipitoisuus nousee riittävän korkealle ja progesteronin inhibitorinen vaikutus on lakannut, aktivoituu preovulatorinen GnRH-

keskus alkaen erittää runsaasti GnRH:ta, mikä puolestaan aikaansaa LH-erityspiikin, joka johtaa ovulaatioon (Senger 2003).

GnRH-injektioilla on potentiaalia stimuloida keltarauhasen muodostusta, toimia kiimansynkronoinnissa, parantaa kohdun involuutioastetta, indusoida poikimisen jälkeistä ovulaatiota, viivästyttää keltarauhasen surkastumista ja hoitaa rakkuloita. Lisäksi pienet annokset indusoivat toimimattomia munasarjoja aktivoitumaan. Suurilla annoksilla puolestaan voidaan saada aktiviteetti loppumaan (Thatcher ym. 1993).

GnRH:n tai sen agonististen analogien injisointi aiheuttaa LH:n ja FSH:n akuutin nousun 3–5 tunnin ajaksi ja vaikuttaa näin epäsuorasti keltarauhasen toimintaan. GnRH:n vaikutuksesta LH vapautuu hyvin ennustettavalla tavalla, minkä vuoksi GnRH ja sen analogit ovat farmakologisesti hyvin luotettavia lääkkeitä. Eläimen LH-vaste vaihtelee kuitenkin aina hiukan kiimakierron, mahdollisen tiineyden ja poikimisen jälkeisen vaiheen mukaan (Thatcher ym. 1993).

GnRH:lla indusoitu LH-eritys saa aikaan paljon endokrinologisia ja fysiologisia muutoksia keltarauhasen ja follikkelin toiminnassa. Useat injektiot keskidiestruksessa tai yksi injektio myöhäisessä diestruksessa aiheuttaa plasman progesteronipitoisuuden nousun ja luteolyysin viivästymisen (Thatcher ym. 1993). Kiima estyy kuudeksi päiväksi (Twagiramungu ym. 1992a).

GnRH-injektiot synkronoivat follikkelien kehitystä saamalla dominoivan follikkelin joko luteinisoitumaan tai ovuloitumaan. Uusi dominoiva follikkeli valikoituu seitsemän vuorokauden kuluttua. Metestruksessa annettu GnRH vaikuttaa keltarauhassolukon järjestäytymiseen ja erilaistumiseen, minkä vuoksi progesteronipitoisuudet jäävät normaalia matalammiksi. Nämä vaikutukset tapahtuvat LH:n kautta (Thatcher ym. 1993).

GnRH:lla voidaan saada poikimisen jälkeisessä anestruksessa olevat lehmät sykloimaan. GnRH synkronoi yhtä tehokkaasti sekä anestruksessa olevia että sykloivia

eläimiä (Twagiramungu ym. 1992a). Estruksen alkuun kulunut aika ja hedelmöitymisprosentit ovat samankaltaisia sykloimattomilla ja sykloivilla eläimillä (Twagiramungu ym. 1992b).

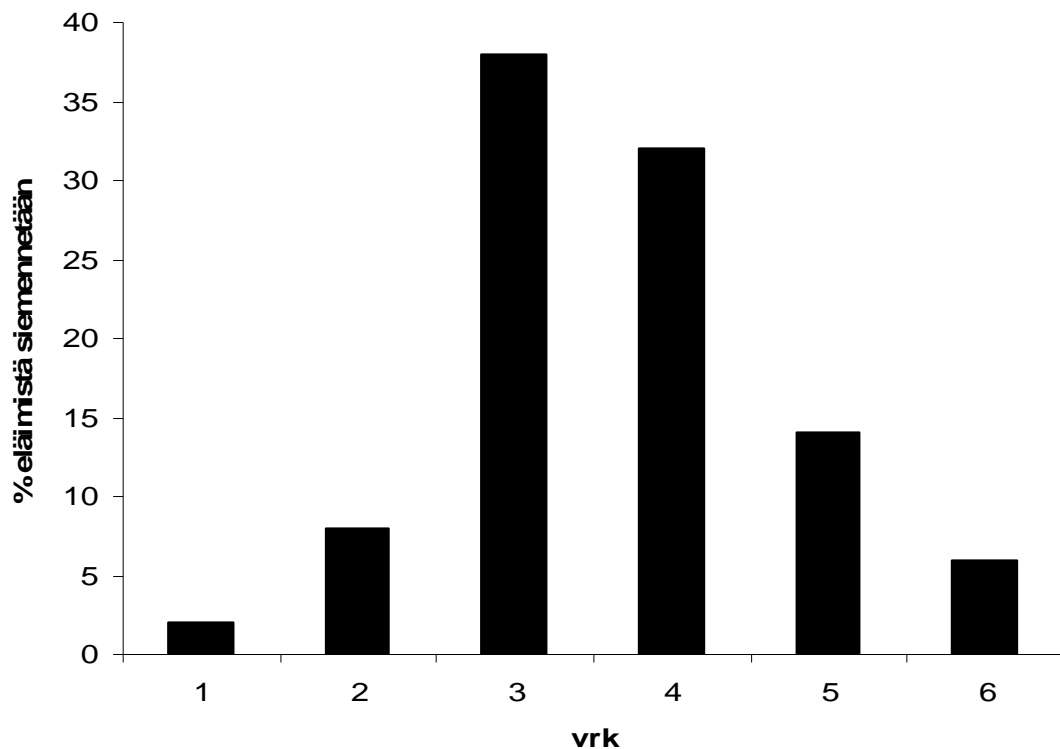
Lee ym. (1983) totesivat, että kun lehmälle annetaan 100 µg GnRH:ta lihakseen päivänä 14 poikimisen jälkeen tai siemennyskauden ensimmäisenä päivänä, joka vaihteli yksilöllisesti ollen keskimäärin hieman yli 60 vuorokautta poikimisesta, saadaan hedelmöitymisprosentti nousemaan 15–18 prosenttiyksikköä. Kiimaneusijoilla kolmannen siemennyksen yhteydessä annettu GnRH-injektio parantaa hedelmöitymistä 25 %. Sen sijaan hiehoilla ensimmäisen siemennyksen yhteydessä annettu GnRH-injektio ei paranna tiinehtyvyyttä (Lee ym. 1983).

4 KIIMANSYNKRONOINTIOHJELMIA

4.1 $PGF_{2\alpha}$ -menetelmiä

Yksittäisille lehmille prostaglandiini-injektioita annetaan kiimantarkkailua käyttävissä karjoissa, jos kiimaa ei ole havaittu 21 vuorokauden sisällä siemennyskauden alusta tai siemennyksen jälkeen (eikä lehmä ole tiine). Hiljaista kiimaa epäiltäessä munasarjoja palpoitaessa pitäisi löytää 55 % eläimistä diestruksessa, 15 % proestruksessa, 5 % estruksessa ja 25 % metestruksessa. Munasarjoja palpoimalla arvioidaan tulevan kiiman ajankohta tai annetaan diestruksessa oleville prostaglandiini-injektio (Seguin 1997). Tällaisilla eläimillä luteolyysivaste on 91 % $PGF_{2\alpha}$ -injektion jälkeen (Stevenson ym. 1987).

Hiljaisen kiiman vuoksi $PGF_{2\alpha}$:lla hoidetuista lehmistä tulee siemennetyksi vain 65 %, koska kiima jää jälleen havaitsematta tai eläimellä ei ole ollut keltarauhasta, joka vastaisi $PGF_{2\alpha}$:aan. $PGF_{2\alpha}$:n jälkeinen siemennys ajoittuu eri päiville kuvan 1 osoittamalla tavalla (Seguin 1997).



Kuva 1. Siemennyksen ajoittuminen eri päiville PGF_{2α}-injektion jälkeen.

PGF_{2α}:n jälkeen kiimoja pitää tarkkailla 2–3 kertaa päivässä ja siementää vain seisovaan kiimaan. Vaihtoehtoisesti suoritetaan ajoitettu siemennys mielellään kahdesti. Hiehot siemennetään lehmiä aiemmin. Sekä lehmillä että hiehoilla kiima tulee aiemmin, mikäli prostaglandiini ajoittuu kiiman jälkeisiin vuorokausiin 7–9 verrattuna päiviin 10–13. Tämä liittyy follikkeliaaltojen kehitykseen. 20 % lehmistä tarvitsisi tiinehtyäkseen kolmannen ajoitetun siemennyksen, koska ne ovat kiimassa vasta myöhemmin. Yksi ajoitettu siemennys aikaansaa tiinehtymisen 25–30 %:ssa tapauksista (Seguin 1997).

PGF_{2α}:aa voidaan käyttää myös menetelmässä, jossa siemennettävät eläimet tutkitaan rektaalisesti tai progesteroninäytteillä. Niille eläimille, joilla on toimiva keltarauhanen, annetaan PGF_{2α}-injektio, jonka jälkeen ne siemennetään näkyviin oireisiin tai ajoitetusti. Käytössä on myös niin sanottu 12 vuorokauden ohjelma, jossa kiimoja tarkkaillaan 7 päivän ajan, ja kiimaa näyttävät eläimet siemennetään. Ne, jotka eivät ole näyttäneet kiimaa 7 päivässä, saavat PGF_{2α}-injektion, jonka jälkeen kiimaa seurataan jälleen 5 vuorokautta ja siemennetään kiimaoireiden perusteella (Seguin 1997).

4.1.1 Kaksi PGF_{2α}-injeksiota

1970-luvulla keksittiin, että kiimat voidaan synkronoida kohtuullisen tehokkaasti antamalla kaksi PGF_{2α}-injeksiota 11–14 vuorokauden välein. Injektioiden jälkeen eläin voidaan siementää näkyviin oireisiin tai ajoitetusti toisen injektion jälkeen (Seguin 1997). 10–12 päivän välein annetut PGF_{2α}-injektiot synkronoivat kiiman teoriassa kaikilla naudoilla (Cooper ym. 1974, Dobson ym. 1975, Hafs 1976). Ensimmäistä injeksiota seuraa kiima 48–96 tunnin kuluttua. Toisen PGF_{2α}-injection jälkeen kiima tulee hieman nopeammin, 48–55 tunnissa (Dobson ym. 1975). Käytännössä on todettu, että 91 % hiehoista on kiimassa 48–72 tuntia ja 98 % 48–96 tuntia PGF_{2α}-injection jälkeen (Cooper ym. 1974).

Sekä Lucy ym. (1986) että Stevenson ym. (1987) tutkivat keltarauhasen vastetta ja tiinehtyvyyttä kahden 11 vuorokauden välein annetun PGF_{2α}-injection jälkeen. Molemmissa tutkimuksissa luteolyysivaste ensimmäisen injektion jälkeen oli 60 %. 30 %:lla eläimistä oli matala progesteronipitoisuus, mikä johtuu joko follikulaarivaiheesta tai aneestruksesta. Toisen injektion jälkeen luteolyysivaste nousi 72 %:iin. Kummassakin tutkimuksessa havaittiin, että toimivista keltarauhasista vastasi kumpaankin injektioon vain 85 %. Stevensonin ym. (1987) tekemässä tutkimuksessa 63 % kaikista eläimistä vastasi molempiin injektioihin. Näillä lehmillä kiimaoireet olivat selvimmät ja tiinehtyvyys parasta. 5 % ensimmäiseen injektioon vastaamattomista lehmistä vastasi kuitenkin toiseen injektioon. 31 %:lla näistä eläimistä oli ollut alhainen progesteronipitoisuus ensimmäisen injektion aikaan. 13 % eläimistä ei vastannut toiseen injektioon, vaikka 70 % niistä oli vastannut ensimmäiseen.

Jotta kahden PGF_{2α}-injection ohjelma tehoaisi, lehmällä on oltava toimiva keltarauhanen, joka vastaa PGF_{2α}-injektioon, jonka jälkeen muodostuu uusi, toimiva keltarauhanen, joka vastaa PGF_{2α}-injektioon 11 vuorokauden kuluttua. Epäonnistuminen voi johtua siitä, ettei kunnan keltarauhasta synny PGF_{2α}:n jälkeen tai keltarauhanen ei vastaa PGF_{2α}-injektioon tai lehmä on aneestruksessa. Noin 5 % lehmistä ei syklöi vielä 57 vuorokautta poikimisen jälkeen (Lucy ym. 1986). PGF_{2α}-injektioiden välin pitää olla tarpeeksi lyhyt, jotta toinen injektio osuu diestrukseseen, mutta tarpeeksi pitkä, jotta uusi keltarauhanen on kypsä vastaamaan PGF_{2α}:aan. Hyvä injektioväli on

hiehoille 11 ja laktoiville lehmille 14 vuorokautta. Hiehoilla keltarauhanen vastaa prostaglandiiniin laktoivia lehmii nopeammin ja niiden diestrusvaihe on lyhyempi. 14 vuorokauden ohjelman etuna on se, että injektiot tulevat aina samana viikonpäivänä (Seguin 1997).

Kiimantarkkailua käytettäessä tiinehtyvyys on kahden $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektion ohjelmia käytettäessä 38 % siemennettäessä kerran ja 55 % siemennettäessä kahdesti. Tiinehtymistä estää 13 %:lla luteolyysin epäonnistuminen ja 15 %:lla alhainen ($<1\text{ng/ml}$) $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektiota edeltävä progesteronipitoisuus (Stevenson ym. 1987).

4.1.2 Maanantaiaamuohjelma

Yhdysvalloissa on käytössä menetelmä, jossa joka maanantaiaamu siemennettävien lehmien munasarjat tutkitaan. Ne, joilla tuntuu kunnon keltarauhanen, saavat $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektion, ja niiden kiimoja tarkkaillaan kerran päivässä aamuisin. Väli siemennyskauden alusta tiinehtymiseen lyhenee tällä menetelmällä 18 vuorokaudella perinteistä kiimantarkkailua käyttäviin kontrolleihin verrattuna. Suurin osa eläimistä siemennetään päivinä 2–5 $\text{PGF}_{2\alpha}$:n jälkeen (88 % ensimmäisistä siemennyksistä, 82 % kaikista). Tiineysprosentti on päivinä 2–5 siemennetyillä 57,5 %; muina päivinä siemennetyillä se on 46,5 %. Tämän menetelmän ongelmana ovat ne eläimet, joiden kiimat eivät osu niihin neljään päivään, jolloin kiimoja tarkkaillaan. Tällä ohjelmalla on saatu lisää tuottoa \$76/lehmä/vuosi (Seguin 1997).

Tärkeää maanantaiaamuohjelmassa on saada tehtyä tiineystarkastus mahdollisimman pian, jotta tyhjät eläimet saadaan synkronoitua uudelleen. Tavallisin synkronoinnin väli on 14 vuorokautta, joskin suurissa karjoissa on ohjelmia aloitettu joka viikko, jolloin väli on 7 päivää (Seguin 1997).

Tyydyttäviä tuloksia on saatu myös menetelmällä, jossa annetaan joka maanantaiaamu prostaglandiinipistos kaikille siemennettäville lehmille ilman tutkimuksia. Kolmas käytössä oleva $\text{PGF}_{2\alpha}$ -pohjainen menetelmä on antaa yksi $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektio kaikille eläimille, jonka jälkeen siemennetään kiimaoireisiin. Mikäli 11–14 vuorokauden

kuluttua ei kiimaa ole havaittu, annetaan toinen injektio. Toiseen injektioon vastanneet eläimet siemennetään joko näkyvään kiimaan tai käytetään ajoitettua siemennystä (Seguin 1997).

4.1.3 Target breeding program™

USA:ssa on kehitetty myös ohjelma, jolle on annettu nimeksi Targeted Breeding™. Tässä ohjelmassa eläimille annetaan ensimmäinen PGF_{2α}-pistos 14 vuorokautta ennen siemennyskauden alkua, jotta ne olisivat siemennysvalmiita heti kauden alussa. Lepokauden pituutta vaihdellaan lehmäkohtaisesti muun muassa laktaatiokausion lukumäärän mukaan. Yleensä injektio annetaan sokkona ilman tutkimuksia. 14 vuorokautta myöhemmin annetaan tälle ryhmälle toinen injektio ja seuraavalle ryhmälle ensimmäinen. Hoitopäiväksi valikoidaan sellainen viikonpäivä, josta 3–6 päivän kuluttua lehmien on otollista olla kiimassa. Mikäli lehmän ei ole havaittu olevan kiimassa kahden injektion jälkeen, saa se edelleen kolmannen jne. injektion, kunnes kiima havaitaan. Karjan lisääntymistehokkuus paranee, ja enemmän siemennyksiä saadaan ajoitettua samalle viikonpäivälle, jolloin siementäjää ei tarvita niin usein (Seguin ym. 1997).

4.1.4 Ajoitettu siemennys PGF_{2α}-ohjelmissa

Ajoitetulla siemennyksellä (timed artificial insemination, TAI) tarkoitetaan siemennystä, joka suoritetaan tiettyyn aikaan esimerkiksi synkronointiprotokollan jälkeen ilman kiimantarkkailua tai munasarjadiagnostiikkaa. Ajoitettua siemennystä käytettäessä säästetään työvoimakuluissa, mutta usein lääkekustannukset nousevat hieman. Lisäksi joskus ajoitettua siemennystä käytettäessä joudutaan siementämään useamman kerran kelvollisen tuloksen saavuttamiseksi, jolloin siemennyskustannukset suurenevat. Jos kiimantarkkailu on todella tehotonta (alle 40 % kiimoista havaitaan), siemen halpaa tai PGF_{2α}:aan vastaavan keltarauhasen diagnosointi yli 90 %:n luokkaa, on taloudellisesti kannattavaa käyttää ajoitettua siemennystä prostaglandiinihoitojen yhteydessä (Seguin 1997).

Ajoitetussa siemennyksessä voidaan käyttää esimerkiksi kahta siemennystä lehmillä 72 ja 96 tuntia tai hiehoilla 60 ja 80 tuntia toisen injektion jälkeen (Seguin 1997). PGF_{2α}-protokollaa käytettäessä ajoitetulla siemennyksellä ei päästä yhtä hyvään tiinehtyvyyteen kuin käytettäessä kiimantarkkailua (Lucy ym. 1986). Kuitenkin ajoitetuilla siemennyksillä 88 tuntia yhden PGF_{2α}-injektion jälkeen (Oxender ym. 1974) tai 72 ja 90 tuntia (Hafs ym. 1974) tai 80 tai 70 ja 88 tuntia (Hafs 1976) kahden PGF_{2α}-injektion jälkeen on saatu myös kelvollisia tiineystuloksia. Ajoitetuilla siemennyksillä 72 ja 96 tuntia injektion jälkeen on saatu poikimisprosentiksi 60 (Cooper ym. 1974). Lucy ym. (1986) totesivat, että ajoitettu siemennys 80 tuntia PGF_{2α}:n annon jälkeen lyhentää siemennyskautta ja vähentää siinä esiintyvää vaihtelua verrattuna tuplasiemennykseen 72 ja 96 tuntia PGF_{2α}-injektion jälkeen.

Verrattaessa tiinehtymistä ajoitetun siemennyksen ja kiimantarkkailun jälkeen tulee vertailukeinoon kiinnittää huomiota. Ajoitetussa siemennyksessä kaikki eläimet siemennetään, kun taas kiimantarkkailumenetelmissä kiimattomat eläimet jäävät siementämättä, millä voi olla merkittävä vaikutus tulokseen. Parempi vertailumenetelmä tilanteesta riippuen voisi olla tiineysprosentti kiimakiertojen määrää kohden tai tiineyksien määrä aikayksikköä kohden (Seguin 1997).

Siirryttäessä kiimantarkkailupohjaisista menetelmistä ajoitettuun siemennykseen kannattaa lepokauden pituuteen kiinnittää erityistä huomiota, jos siemennyskausi on aiemmin venynyt pitkäksi. Ajoitettua siemennystä käyttävät menetelmät eivät ole riippuvaisia kiimantarkkailun tehokkuudesta, joten sen avulla saadaan eliminointia tästä johtuvat pitkät siemennyskaudet. Mikäli siemennyskausi aloitetaan totuttuna ajan-kohtana, saattavat laktaatiokausi ja ummessaolokausi jäädä liian lyhyiksi. Aloittamalla siemennyskausi totuttua myöhemmin saadaan eliminointia lyhyet laktaatiokaudet ja suurempi osa eläimistä on ehtinyt aloittaa kiimakiertonsa kunnolla. Lisäksi hedelmöityminen ensimmäiseen siemennykseen lisääntyy (Seguin 1997).

4.2 GnRH ja PGF_{2α}

PGF_{2α}:n käyttöön perustuvissa synkronointiohjelmissä ongelmana on suurehko hajonta kiimaan tuloon kuluva ajassa. 1990-luvun alkupuolella alettiin kokeilla GnRH:n yhdistämistä PGF_{2α}-protokolliin. GnRH:ta eritetään hypothalamuksesta. Toonisen keskuksen matalafrekvenssinen GnRH vapauttaa matalia, basaalitason LH- ja FSH-pulsseja, jotka vaikuttavat follikkelien kehitykseen. Estradiolin aikaansaaman positiivisen feedbackin stimuloimana aktivoituu GnRH:n aaltokeskus, jonka erittämä GnRH-pulssi vapauttaa suuren määrän etenkin LH:ta, joka saa dominoivan follikkelin ovuloitumaan (Arthur ym. 1989). Eksogeenisen GnRH-injektion tavoitteena on saada aikaan LH-pulssi ja sitä kautta dominoivan follikkelin ovulaatio tietyssä ajanhetkenä, jotta ajoitettu siemennys onnistuisi paremmin (Seguin 1997).

Diestruksessa annetut toistuvat GnRH-injektiot tai myöhäisessä diestruksessa annettu yksittäinen GnRH-injektio aiheuttavat akuutin plasman progesteronipitoisuuden nousun ja keltarauhasen surkastumisen viivästymisen. GnRH-injektio ennen PGF_{2α}:aa vähentää kiiman alkamishetken vaihtelua, koska sekä follikkelikehitys että keltarauhasen regressio synkronoituvat (Thatcher ym. 1993). Kun GnRH:ta annetaan kuusi päivää ennen PGF_{2α}:aa, saavutetaan parempi synkronisaatio ja kiimantarkkailuun tarvittava aika vähenee tiineystuloksen heikkenemättä (Twagiramungu ym. 1992a). Vaste GnRH-injektioon riippuu syklin vaiheesta hoidon aloitushetkellä. GnRH-vaste on huono metestruksessa ja myöhäisessä diestruksessa, jolloin ovulaatiovastetta ei saada aikaan lainkaan. Sen sijaan proestruksessa sekä diestruksen alku- ja keskivaiheilla vaste on parhaimmillaan (Cavestany ym. 2003).

Käytettäessä menetelmää, jossa annetaan GnRH ja kuuden päivän kuluttua PGF_{2α}-injektio, saadaan synkronoituvuutta tarkennettua verrattuna pelkkää PGF_{2α}:tä käyttävään kontrolliin. Mikäli eläimellä on suuri (>1 cm) follikkeli GnRH-injektiopäivänä, parantuu synkronisaatio entisestään (Twagiramungu ym. 1992a). GnRH:lla indusoidussa ovulaatiossa fertiliteetti on hyvä. Tuloksiin vaikuttavat kuitenkin voimakkaasti myös muut tekijät. GnRH:lla ei tule yrittää korvata eläinten ylläpidon ja hoidon puutteita (Thatcher ym. 1993).

Twagiramungu ym. (1992b) kokeilivat kahden GnRH:n vaikutusta synkronoituvuuteen. He antoivat satunnaisessa kiimakierron vaiheessa oleville eläimille kaksi GnRH-injektiota päivinä 0 ja 3, jonka jälkeen he antoivat PGF_{2α}-injektion päivänä 6. Ne eläimet, jotka eivät olleet näyttäneet kiimaa, saivat toisen PGF_{2α}:n päivinä 9 luteolyysivasteen varmistamiseksi. Tätä menetelmää verrattiin menetelmään, jossa annettiin yksi GnRH-injektio päivänä 0 ja PGF_{2α}-injektio päivänä 6. Kahdella GnRH-injektioilla saatiin aikaan tarkempi ovulaation synkronisaatio. Tiineystulokset olivat kuitenkin molemmilla ryhmillä samanlaisia (Twagiramungu ym. 1992b).

GnRH-injektioita on annettu myös PGF_{2α}:n jälkeen tavoitteena vaikuttaa kiimafollikkelin ovulaatiohetkeen, jolloin päästäisiin siementämään ajoitettusti. Lucy ym. (1986) tekemän tutkimuksen perusteella pääteltiin, että ajoitettua siemennystä käytettäessä GnRH:n anto 80 tuntia PGF_{2α}:n jälkeen parantaa tiinehtyvyyttä, joka kuitenkin jää tarkkailuun perustuvien siemennysten tiineystuloksia huonommaksi. GnRH 72 tuntia injektion jälkeen paransi tiinehtyvyyttä, mikäli siemennys tapahtui kahdeksan tuntia myöhemmin. GnRH-injektio luteaalivaiheessa madalsi progesteronipitoisuutta. Archbald ym. (1992) vertasivat yhden PGF_{2α}-injektion jälkeen 72 tunnin kuluttua annettua PGF_{2α}:aa, GnRH:ta ja PGF_{2α}:aa sekä GnRH:ta. Pelkkä GnRH sai aikaan parhaimman hedelmöitymistuloksen käytettäessä ajoitettua siemennystä. GnRH:n paremmuus muihin hoitomuotoihin verrattuna korostui keväällä. Toinen PGF_{2α}-injektio kolme vuorokautta ensimmäisen jälkeen ei synkronoinut ovulaatiota, mutta GnRH teki niin.

4.2.1 Ovsynch

Ovsynch-protokolla esiteltiin ensimmäisen kerran 1995 (Pursley ym. 1995). Tässä protokollassa lehmät saavat satunnaisessa kiimakierron vaiheessa GnRH-injektion. Seitsemän vuorokauden kuluttua tästä injektioista ne saavat PGF_{2α}-injektion. Kahden vuorokauden kuluttua PGF_{2α}:sta ne saavat toisen GnRH-injektion, jonka jälkeen ne siemennetään 24 tunnin kuluttua. Mihinkään vaiheeseen ohjelmaa ei sisälly kiiman-

tarkkailua tai munasarjadiagnostiikkaa, jolloin säästetään työvoimakustannuksissa. Myöhemmissä tutkimuksissa protokollan siemennysajankohtaa on aikaistettu noin 16–20 tuntiin toisen GnRH:n jälkeen (Stevenson ym. 1996, Pursley ym. 1997, Stevenson ym. 1999, Moreira ym. 2001).

Ensimmäisen GnRH:n on tarkoitus synkronoida follikkeliaalto ja varmistaa, että viikkoa myöhemmin munasarjassa on sekä kypsä keltarauhanen että ovulaatiokykyinen follikkeli. GnRH estää lehmien kiimaantulon ennen $\text{PGF}_{2\alpha}$:aa, joka saa kypsän keltarauhasen regressoitumaan. Toinen GnRH kaksi vuorokautta $\text{PGF}_{2\alpha}$:n jälkeen saa aikaan dominoivan follikkelin ovulaation. Ovsynch-ohjelmassa ei tarvita kiiman-tarkkailua. Toinen GnRH-injektio estää joitakin eläimiä näyttämästä kiimaoireita (Seguin 1997).

Ovsynch-protokollan onnistumiseen vaikuttaa jonkin verran se, missä vaiheessa kiimakiertoa ohjelma aloitetaan. Vasconcelosin ym. (1999) mukaan keskimääräinen lehmien ovulaatiovaste GnRH-hoittoon oli 64 %. Kiimakierron alkupäivinä aloitetussa protokollassa vain 23 % lehmistä ovuloi ensimmäisen GnRH:n vaikutuksesta. Tämä johtuneesi siitä, että varhaisessa diestruksessa vain harvalla follikkelilla on granuloosa-soluissaan LH-reseptoreita ja täten ovulaatiokapasiteettia. Sen sijaan kiimakierron päivinä 5–9 ovuloi jopa 96 % eläimistä. Keskisyklissä ovulaatiovaste GnRH:lle oli 54 % ja myöhäisessä syklin vaiheessa 77 %. Kiimakierron puolivälissä ensimmäisen aallon dominoiva follikkeli menettää funktionaalisen dominanssinsa, eikä enää vastaa LH-aaltoon. Tänä toisen follikkeliaallon valintavaiheen aikana eläimellä ei ole follikkelia, joka voisi reagoida GnRH-injektioon.

Vasconcelos ym. (1999) saivat synkronoituvuusvasteeksi Ovsynch-ohjelmalla (ovulaatioprosentti toisen GnRH:n jälkeen) 87 %. Vaste $\text{PGF}_{2\alpha}$:lle oli ollut hyvä, sillä 93 %:lla eläimistä oli alhainen veren progesteronitaso toisen GnRH-injektion aikaan. Ne eläimet, jotka vastasivat ensimmäiseen GnRH:iin, vastasivat myös toiseen 92 %:n varmuudella, kun taas ne, jotka eivät olleet ovuloineet ensimmäisestä GnRH:sta, synkronoituivat 79-prosenttisesti. 6 % eläimistä ovuloi ennen toista GnRH-injektiota, ja 7 % ei ollut ovuloinut 48 tunnin sisällä injektion jälkeen.

Lehmät, jotka ovuloivat ensimmäisen GnRH:n seurauksena, synkronoituvat muita paremmin. Samoin aikaisessa syklin vaiheessa aloitettu protokolla synkronoi eläimet myöhemmässä vaiheessa aloitettua paremmin (Vasconcelos ym. 1999). Erityisen tärkeää follikkelin ovuloituminen ensimmäisen GnRH-injektion seurauksena on injektion ajoittuessa myöhäiseen luteaalivaiheeseen (Pursley ym. 1997, Vasconcelos ym. 1999). Vasconcelos ym. (1999) saivat synkronoitumaan vain 36 % niistä eläimistä, jotka olivat kiimakierron myöhäisessä luteaalivaiheessa, ja jotka eivät vastanneet ensimmäiseen GnRH-injektioon. Mikäli follikkeli ei ovuloidu, eläin jatkaa omaa kiimakiertoaan normaaliin tapaan (Pursley ym. 1997).

Pursley ym. (1997) saivat Ovsynch-ohjelmalla tiineysprosentiksi 37,8 %, kun se kahta PGF_{2α}-injektiota ja kiimantarkkailua käyttävillä kontrolleilla oli 38,9 %. Ajoitettua siemennystä käytettäessä Ovsynchillä oli yhden PGF_{2α}:n ohjelmaan nähden huomattava etu: tiineytyvyys on 38 %, kun se pelkällä PGF_{2α}:lla oli vain 8,3 %. PGF_{2α} vaikuttaa ainoastaan keltarauhasen surkastumiseen eikä lainkaan uuteen follikkeliin. Ovsynchissä taas päästään GnRH:n avulla vaikuttamaan ovulaatiohetkeen. Ovsynchin onnistumisen perusta on sekä keltarauhasen vaste PGF_{2α}:aan että follikkelin vaste GnRH:iin (Pursley ym. 1997). Cordoba ja Fricke (2002) totesivat, että Ovsynch-ryhmällä on lyhyempi tyhjäkausi verrattuna kiimantarkkailua käyttäviin kontrolleihin.

Pursley ym. (1997) havaitsivat, että toisin kuin muut kiimansynkronointimenetelmät, toimii Ovsynch hiehoilla laktoivia lehmiä huomattavasti huonommin. Ovsynch tuotti tiineyden vain 35,1 %:lle, kun kahdella prostaglandiini-injektiolla saatiin tarkkailun kanssa 74,4 %:n tiineystulos. 86,2 %:lla lehmistä oli PGF_{2α}:n antohetkellä korkea progesteronipitoisuus verrattuna hiehojen 59,5 %:iin. Lehmien follikkelit reagoivat LH:iin hiehoja suuremman osan syklistä. Pursley ym. (1995) havaitsivat hiehojen vasteen GnRH:lle olevan 54 %:n luokkaa verrattuna lehmien 85 %:iin. Pursley ym. (1997) totesivat lisäksi, ettei hiehojen keltarauhaskehitys synkronoidu odotetulla tavalla GnRH:n seurauksena, mistä johtuen niiden oma kiimakierto pääsee välillä vaikuttamaan tuloksiin.

Ultraäänitutkimusten ja progesteronimääritysten perusteella on osoitettu, että 20 % lehmistä ei ole ovuloinut vielä 60 päivää poikimisen jälkeen. Ensikoista tässä tilassa on 28 % ja useammin poikineista 15 %. 20 %:lla anovulatorisista eläimistä on persistoiva follikkeli. Ovsynch-protokollalla anovulatorisista lehmistä saadaan ovuloimaan 94 % verrattuna sykloivien eläinten 97 %:n vasteeseen (Gümen ym. 2003).

Korkea (>2,5 ng/ml) progesteronipitoisuus ennen kiimansynkronointia ennustaa hyvää tiinehtymistä. Ne munasarjoiltaan toimimattomat lehmät, jotka ovuloivat Ovsynch-ohjelman molempien GnRH-injektion jälkeen, tiinehtyvät paremmin kuin ne, jotka ovuloivat vain jälkimmäisen GnRH:n jälkeen. Tämä johtuu siitä, että molempien injektioiden jälkeen ovuloineet eläimet altistuvat pidemmän aikaa progesteronille. Jo viiden päivän progesteronialtistus (>1 ng/ml) parantaa tiinehtyvyyttä. 75 % eläimistä, jotka ovat anestruksessa, ovuloi vähintään toisen GnRH:n jälkeen. Tiineysprosentti on molempiin GnRH-injektioihin vastanneilla eläimillä sykloivien kanssa samalla tasolla, 39,6 %. 90,5 % ensimmäiseen GnRH:iin vastanneista ovuloi myös toisen injektion jälkeen (Moreira ym. 2001).

Keister ym. (1999) aloittivat Ovsynch-ohjelman seitsemän vuorokautta kiiman alusta, jolloin keltarauhanen oli PGF_{2α}-injektion antohetkellä optimaalisesti 14 vuorokauden ikäinen, jolloin sen pitäisi vastata hyvin hormoniin. Tyhjäkausi saatiin lyhenemään tässä tapauksessa 7–10 vuorokaudella verrattuna Ovsynchin keskiarvoon, ja 9–24 vuorokaudella verrattuna kontrollien tyhjäkauteen. Kontrolleihin verrattuna Ovsynch-menetelmillä oli 45 vuorokautta hoidon jälkeen selvästi enemmän useammin kuin kerran poikineita lehmiä tiineinä. Kontrolleihin verrattuna toisessa siemennyksessä oli Ovsynchillä 10 % ja seitsemän vuorokautta syklin alusta aloitetulla Ovsynchillä 20 % parempi hedelmöityminen. Tiineysprosentit olivat vastaavasti 15 ja 30 prosenttiyksikköä parempia kuin kontrolleilla.

4.2.2 CoSynch, GnRH:n ajoituksen merkitys ja lyhyet kiimakerrot

CoSynch-ohjelmassa annetaan ensimmäinen GnRH satunnaisella kiimakierron hetkellä ja PGF_{2α} seitsemän vuorokauden kuluttua yhtä aikaa toisen GnRH:n kanssa. Menetelmän etuna on työvoiman säästö hoitokertojen vähentyessä Ovsynch-protokollaan verrattuna. Peters ja Pursley (2003) vertasivat menetelmää Ovsynch-protokollaan, jolla saatiin CoSynch-menetelmää parempi tiinehtyvyys. Myös ovulatorisen follikkelin koko oli Ovsynchillä CoSynchiä suurempi.

CoSynch-ohjelmalla saatua heikompaa tiinehtymistä voidaan selittää sillä, että PGF_{2α}- ja GnRH-injektoiden välisellä ajalla on havaittu olevan positiivinen lineaarinen vaikutus tiinehtyvyyteen. Kun aika keltarauhasen surkastumisesta ja progesteronin laskusta ennenaikaiseen LH-piikkiin kasvaa, paranee tiinehtyvyys. Tämän ajan suhteen on oltava hyvin tarkka, sillä viimeisen GnRH:n tulee ajoittua kuitenkin ennen spontaania LH-piikkiä, jotta ovulaatio saadaan synkronoitua. Tiinehtyvyys on huonompi alle 24 tuntia toisistaan annetuilla injektioilla (Peters & Pursley 2003).

GnRH:n anto yhtä aikaa PGF_{2α}:n kanssa näyttäisi lisäävän epänormaalien, lyhyiden luteaalivaiheiden esiintymistä (Peters & Pursley 2003). Schmitt ym. (1996) havaitsivat, että toisen GnRH:n ajoittaminen 24 tuntia PGF_{2α}:n jälkeen 48 tunnin sijasta lisäsi normaalipituista kiimakiertoa lyhyempien kiimakiertojen osuutta 15,5 %:sta 34,8 %:iin. Koska pelkkä ensimmäinen GnRH ja PGF_{2α} seitsemän vuorokauden kuluttua eivät suoraan aiheuttaneet lyhyitä syklejä, johtuvat ne todennäköisesti toisesta GnRH:sta. Kun toinen GnRH-injektio vaihdettiin human chorionic gonadotropiiniin (hCG), pysyi tiineystulos samana, mutta lyhyet kiimakerrot vähenivät.

Schmitt ym. (1996) otaksuivat lyhyiden syklien johtuvan viivästyneestä preovulatorisen follikkelin kehityksestä laktoimattomilla eläimillä, jolloin GnRH-injektio aiheuttaa LH-piikin liian aikaisin follikkelin kehitykseen nähden, eikä follikkeli pysty ovuloitumaan. Tämän seurauksena muodostuu keltarauhanen, jolla on normaalia lyhyempi elinkaari.

Vaihtoehtoisesti lyhyet syklit saattavat johtua keltarauhasen surkastumisen epäonnistumisesta tai epätäydellisestä follikkelin ja munasolun kypsymisestä. Liian aikaisin annettu GnRH voi estää PGF_{2α}:n aiheuttaman luteolyysin, jolloin keltarauhanen jatkaa elämäänsä normaalia pitemmälle ja ”lyhyt sykli” onkin normaalia pitemmän syklin loppuosa. Progesteronitaso GnRH:n antopäivänä ei kuitenkaan vaikuta lyhyiden syklien esiintymiseen (Schmitt ym. 1996). Schmitt ym. (1996) totesivat, että vain 26 %:lla hiehoista plasman progesteronipitoisuus on yli 2 ng/ml GnRH-päivänä, mutta silti 67 %:lla on normaali sykli tai ne tiinehtyvät. Tästä voidaan päätellä, ettei keltarauhasen surkastumisen epäonnistuminen todennäköisesti olekaan primääriongelma tässä tapauksessa. Kun GnRH annetaan vuorokautta myöhemmin, kuten Ovsynchissä, paranee tiineysprosentti, ja lyhyiden syklien osuus vähenee.

Schmitt ym. (1996) tutkivat Ovsynch-menetelmää, jossa toinen GnRH annetaan 24 tunnin kuluttua prostaglandiinista. Tuloksena he saivat huonohkon tiineystuloksen (25,8 %), kun käytettiin ajoitettua siemennystä 15 tunnin kuluttua viimeisestä GnRH:sta. Kun toinen GnRH-injektio annettiin Ovsynch-protokollan mukaan kaksi vuorokautta PGF_{2α}:n jälkeen, saatiin kiimantarkkailua käyttäviä menetelmiä vastaava tiineystulos.

Stevenson ym. (1996) tutkivat tiinehtymistä käytettäessä protokollaa, jossa aloitetaan GnRH:lla, annetaan seitsemän vuorokauden kuluttua PGF_{2α}, josta jälleen 30–32 tunnin kuluttua GnRH, jonka jälkeen 18–19 tunnin kuluttua siemennetään. Tuloksena oli parempi tiineysprosentti kuin yhtä PGF_{2α}-injektiota ja kiimantarkkailua käyttävillä kontrolleilla (35,3 % vs. 26,5 %). Kiimaoireet olivat hoidetuilla lehmillä heikkoja, sillä vain 3,5 %:lla havaittiin seisova kiima.

Kun GnRH ja siemennys ajoitetaan vasta 72 tuntia PGF_{2α}:n jälkeen, saavutetaan normaaliprotokollaa parempi tiinehtyvyys, mutta myös enemmän alkiokuolemia. Poikimisprosentti pysyy kuitenkin Ovsynch-protokollaa suurempana. Verrattuna Ovsynchiin työvoimaa säästyy, sillä käsittelyjä tarvitaan yksi vähemmän. Kuitenkin lehmä saattaa ehtiä näyttämään kiimaa ennen hoitoja, jolloin se pitäisi siementää

näkyvään kiimaan. Tämä toisaalta vaatii kiimantarkkailua, mutta toisaalta vähentää tarvittavaa GnRH-lääkitystä (Portaluppi & Stevenson 2005).

4.2.3 Heatsynch

Heatsynch noudattaa muuten samaa kaavaa kuin Ovsynch, mutta siinä toisen GnRH-injektion sijasta annetaan 24 tuntia prostaglandiinin jälkeen estradiolisypionaattia (ECP) (Rabiee ym. 2005). Toisin kuin Ovsynch-protokollassa käytetään Heatsynchissä kiimantarkkailua. Ennen ajoitettua siemennystä kiimaa näyttävien eläinten siemennys oireiden perusteella parantaa tiineystulosta. Pancarci ym. (2002) havaitsivat, että suurin osa ovulaatioista tapahtuu 48–72 tuntia ECP:n jälkeen. He suosittelevat, että 24 tunnin sisällä ECP-injektion jälkeen kiimaa näyttäneet siemennetään 24 tuntia injektion jälkeen ja loput 48 tunnin kohdalla.

Kasimanickamin ym. (2005) mukaan Heatsynchin jälkeen kiimaoireita esiintyi 59,2 %:lla, kun Ovsynchin jälkeen niitä oli vain 12,9 %:lla eläimistä. Stevenson ym. (2004) puolestaan havaitsivat kiimaoireita Heatsynchin jälkeen 97 %:lla ja Ovsynchin jälkeen 54 %:lla eläimistä. Ovulaatiovaste Ovsynchin viimeiseen GnRH:iin oli 100 %, kun se Heatsynchin ECP:iin oli vain 86 %. LH-piikin kesto oli lyhyempi Ovsynch-ryhmällä, mutta korkein LH-konsentraatio oli yhtä suuri Heatsynchin kanssa. Aika LH-huipusta ovulaatioon oli lyhyempi Ovsynchin jälkeen, mutta piikin alkamishetkestä ovulaatioon kului sama aika molemmilla ryhmillä. ECP:ia käyttämällä saavutettiin enemmän näkyviä kiimaoireita, mutta vähemmän ovulaatioita. Tiineystuloksissa ei ryhmien välillä ollut juurikaan eroja (Stevenson ym. 2004).

Cartmillin ym. (2001) mukaan verrattuna Ovsynchiin Heatsynchissä tiinehtyminen saattaa heikentyä, koska follikkeliaaltoja ei kontrolloida. Siemennys kiimaoireisiin on Heatsynchissä paljon ajoitettua siemennystä tuloksekkaampaa (Kasimanickam ym. 2005).

Pancarci ym. (2002) vertasivat tiinehtymistä Heatsynch- ja Ovsynch-ohjelmilla. Naudat presynkronoitiin kahdella PGF_{2α}-injektiolla 14 vuorokauden välein, jonka jälkeen 14 vuorokauden kuluttua aloitettiin synkronointiohjelma. Tiineystuloksissa ei havaittu eroja ohjelmien välillä. ECP:n jälkeen kiima havaittiin 75,7 %:lla ja ovulaatio 86,5 %:lla eläimistä. ECP:n jälkeen kiima alkoi noin 29 tunnin kuluttua ja ovulaatio seurasi 55,4 tunnin kuluttua. Keinosiementäjät havaitsivat, että Heatsynch-eläimillä oli siemennettäessä parempi kohdun tonus, toimenpide sujui helpommin ja kiimaoireet olivat selvimät kuin Ovsynch-eläimillä. Heatsynch-ohjelman ECP aiheutti tilapäistä maitotuotoksen alenemista. Niiden eläinten, jotka eivät Heatsynch-protokollan jälkeen näyttäneet kiimaa, todettiin tiinehtyvän erittäin huonosti. Tämä johtunee siitä, että ne olivat joko anestruksessa tai eivät olleet synkronoituneet. Ne muutamat eläimet, jotka tiinehtyivät, lienevät olleet hiljaisessa kiimassa. Heatsynchin avulla voidaan siis hyvin löytää anestrusvaiheessa olevat eläimet aikaisessa vaiheessa. Ovsynch puolestaan saa munasarjat toimimaan Heatsynchiä paremmin, mikä johtunee siitä, ettei alikuntoisilla anestruseläimillä ole usein toimivaa positiivista estradiolin feedback-mekanismia hypotalamuksessaan.

4.2.4 Selectsynch

Koska pelkkää PGF_{2α}:ta käytettäessä vaikutetaan ainoastaan keltarauhasen surkastumiseen eikä lainkaan follikkelien kehitykseen, kiimaantulon ajankohta vaihtelee huomattavasti, eikä ajoitettu siementäminen useinkaan ole järkevää. 1980-luvulla esiteltiin ensimmäinen GnRH:ta hyödyntävä kiimansynkronointiprotokolla, Selectsynch. Tässä protokollassa annetaan GnRH-injektio satunnaisessa kiimakierron vaiheessa ja PGF_{2α}-injektio viikon kuluttua. Siemennys tapahtuu kiimaoireiden perusteella (Thatcher ym. 1989). GnRH-injektion tarkoituksena on synkronoida follikkeliaaltoja ja varmistaa, että PGF_{2α}:n annosteluhetkellä munasarjoissa on riittävän ikäinen keltarauhanen. Lääkekustannuksiltaan Selectsynch tulee Ovsynchiä halvemmaksi ja lisäksi säästetään yksi käsittelykerta. Lisäkustannusta tuo kiimantarkkailu (Stevenson ym. 2000).

Stevenson ym. (1999) totesivat, että Selectsynchillä saatiin laktoivilla lehmillä heikompi tiineysprosentti kuin Ovsynchillä. Tähän vaikutti kiimantarkkailun tehottomuus. Sen sijaan hiehoilla Selectsynch oli kahden PGF_{2α}:n protokollan kanssa yhtä tehokas Ovsynchin jäädessä heikommaksi. Ovsynch-protokollan tulos paranisi, kun hiehoja tarkkailtaisiin 40 tuntia PGF_{2α}-injektion jälkeen ja siemennettäisiin kiimaoireiden perusteella kuten Selectsynchissä. Ne hiehot, jotka eivät näyttäisi kiimaa 40 tunnin sisällä PGF_{2α}:sta, saivat GnRH:n 48 tuntia PGF_{2α}:n jälkeen. Tämän jälkeen ne siemennettäisiin ajoitetusti Ovsynch-protokollan mukaisesti (Stevenson ym. 2000).

Burke ym. (1996) vertasivat Selectsynchiä Ovsynchiin. Tiineystulos oli kutakuinkin sama (30,5 % vs. 29,0 %). Selectsynchillä tyhjäkausi jäi kuitenkin pidemmäksi (83,6 vuorokautta vs. 79,2 vuorokautta). Myös vuodenaikaisvaihtelut tiineytyvyydessä olivat Selectsynchiä käytettäessä suurempia.

4.2.5 Esisynkronointi, Presynch

2000-luvun alussa Ovsynchin tuloksia alettiin parannella ns. presynkronoinnilla, koska kuten esimerkiksi Vasconcelos ym. (1999) olivat havainneet, kiimakierron vaihe protokollan aloittamishetkellä vaikuttaa synkronoituvuustulokseen. Kehitetty presynkronointimenetelmä, Presynch, koostuu kahdesta PGF_{2α}-injektiosta 14 vuorokauden välein. 12 vuorokauden (alkuperäisessä ohjelmassa väli Presynchistä Ovsynch-protokollan alkuun oli 14 vuorokautta) kuluttua toisesta injektiosta aloitetaan Ovsynch-protokolla (Moreira ym. 2001). Presynkronointiin on kokeiltu muitakin hormoniyhdistelmiä (Bello ym. 2006).

El-Zarkouny ym. (2004) havaitsivat, että Presynch paransi Ovsynchin tiineytyvyyttä 37,5 %:sta 46,8 %:iin, kun tiineystarkastus tehtiin 29 vuorokautta siemennyksen jälkeen. Navanukraw ym. (2004) vertasivat Ovsynchiä ja Presynchillä presynkronoitua Ovsynchiä. Presynch paransi vastetta sekä ensimmäiseen (5,9 vs. 41,1 %) että toiseen (69,6 vs. 81,1 %) GnRH-injektioon ja paransi tiinehtymistä (37,3 vs. 49,6 %). Poikimakerta, lepokausi tai kuntoluokka siemennys hetkellä eivät vaikuttaneet tiineystulokseen.

Presynch vaikuttaa sykleivien eläinten tiinehtyvyyteen parantamalla sukuelinten terveyttä, lisäämällä siemennystä edeltävien syklien määrää ja ennen kaikkea kohdistamalla lehmien syklit sopiviksi TAI-protokollalle. Presynch lisää sellaisten eläinten osuutta, joilla on korkea plasman progesteronipitoisuus Ovsynchin $\text{PGF}_{2\alpha}$:n kohdalla. Korkea progesteronipitoisuus ennen siemennystä on yhteydessä hyvään tiinehtyvyyteen ensimmäisen siemennyksen yhteydessä Ovsynch-protokollaa käytettäessä (Moreira ym. 2001). Korkea progesteronipitoisuus Ovsynchin prostaglandiini-injektion aikaan on seurausta Presynchin aikaansaamasta pienentyneestä syklin variaatiosta ohjelman alussa. Suurin osa eläimistä, joilla on korkea progesteronipitoisuus sekä Ovsynchin GnRH:n että $\text{PGF}_{2\alpha}$:n injisointihetkellä on syklin päivässä 5–11, kun ohjelma aloitetaan. Ilman presynkronointia kiimakierron päivä on tällöin satunnaisesti mikä tahansa. Presynkronoiduilla eläimillä ensimmäisen aallon dominoiva follikkeli vastaa todennäköisesti GnRH:lla indusoituun LH-aaltoon. Presynkronoimattomat eläimet ovuloivat epävarmemmin, sillä ensimmäinen GnRH voi osua syklin alkupäiville tai toisen follikkeliaallon alkuun päiville 10–15, jolloin dominoiva follikkeli ei ole vielä valikoitunut (Moreira ym. 2001).

Cordoba ja Fricke (2001) sekä LeBlanc ja Leslie (2003) tutkivat presynkronointia yhdellä $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektiolla 10 (Cordoba & Fricke) tai 12 (LeBlanc & Leslie) vuorokautta ennen Ovsynchin aloittamista. Kumpikaan käsittely ei parantanut synkronoituvuutta eikä tiinehtymistä pelkkään Ovsynch-protokollaan verrattuna. Kuitenkin Cartmill ym. (2001) totesivat, että useamman kerran poikineilla eläimillä prostaglandiiniannos ennen Ovsynch-protokollan aloittamista parantaa tiinehtyvyyttä.

Presynkronoitaessa menetelmällä, jossa ensin annetaan $\text{PGF}_{2\alpha}$, sitten kahden vuorokauden kuluttua GnRH, ja josta kuuden vuorokauden kuluttua aloitetaan Ovsynch, saadaan ovulaatiovastetta Ovsynchin ensimmäiselle GnRH:lle parannettua. Presynkronointi parantaa vastetta myös Ovsynchin $\text{PGF}_{2\alpha}$:lle. Mikä tärkeintä, synkronoituvuus Ovsynchin seurauksena paranee (Bello ym. 2006). Peters ja Pursley (2002) kokeilivat samanlaista presynkronointia sillä erotuksella, että $\text{PGF}_{2\alpha}$:n ja GnRH:n väli oli kolme vuorokautta ja väli ennen Ovsynch-protokollaa seitsemän vuorokautta. Tämä menetelmä lisäsi niiden eläinten osuutta, joiden progesteronipitoisuus oli yli 1 ng/ml Ovsynchin

alussa. Tiineysprosentteissa ei ollut merkitsevää eroa (41,5 % verrattuna kontrollien 38,3 %). Suurituottoiset lehmät tiinehtyivät muita paremmin.

Progesteronikuurin käyttäminen Presynchissä seitsemän vuorokauden ajan ennen toista PGF_{2α}-injektiota sopii etenkin anestruksessa oleville eläimille. Menetelmä indusoi poikimisen jälkeisessä anestruksessa olevien eläinten kiimakiertojen alkamista. Progesteroni-presynkronointi lyhentää aikaväliä siemennyskauden alusta ensimmäiseen siemennykseen ja parantaa kiimojen havaitsemista. Ovulaatiovaste Ovsynchin ensimmäiseen GnRH:iin kuitenkin pienenee. Lehmillä, jotka ovuloivat Ovsynch-protokollan ensimmäisen GnRH-injektion jälkeen, on suurempi tiineysprosentti kuin niillä, jotka eivät ovuloi (Chebel ym. 2006).

4.2.3 Uudelleen synkronointi, Resynch

2000-luvun alkupuolella alettiin tutkia, miten synkronointiprotokollan jälkeen tyhjiksi jääneet lehmät voitaisiin synkronoida uudelleen mahdollisimman pian diagnoosin jälkeen. Yleisimmin käytössä on Resynch-menetelmä, johon kuuluu Ovsynch-protokollasta tuttu injektiosarja. Ensimmäinen GnRH annetaan yleensä 26 tai 33 vuorokautta siemennyksen jälkeen (Fricke ym. 2003).

Fricke ym. (2003) vertasivat Resynchin aloitusta päivänä 19, 26 tai 33 siemennyksen jälkeen. Paras tiineystulos, 38 %, saavutettiin 33 vuorokauden kohdalla aloitetulla protokollalla. Päivinä 19 ja 26 aloitetuilla ohjelmilla tiinehtyi 23 ja 34 % eläimistä. Myös Sterry ym. (2006) ovat saaneet samankaltaisia tuloksia (33. vuorokauden ryhmällä tiineitä 39,4 % eläimistä ja 26. vuorokauden ryhmällä 28,6 % eläimistä). Etenkin ensikoilla 33. vuorokautena aloitettu protokolla oli muita tehokkaampi. 19 vuorokautta siemennyksen jälkeen aloitetussa protokollassa joudutaan antamaan ensimmäinen GnRH tietämättä tiineystulosta. Prostaglandiinipäivänä eläinten tiineysstatus tutkitaan ultraäänilaitteen avulla, ja protokollaa jatketaan vain tyhjille eläimille. 26. vuorokautena aloitetussa ohjelmassa tiineys voidaan tutkia rektaalipalpaatiolla 33.

vuorokautena tai vaihtoehtoisesti ultraäänilaitteella 26. vuorokautena, jolloin GnRH:ta ei tarvitse antaa turhaan (Fricke ym. 2003).

Tiineysultraäänitutkimuksen yhteydessä voidaan tutkia myös munasarjojen tilanne. Mikäli keltarauhasta ei havaita, voidaan resynkronisaatioon liittää progesteronikuuri ensimmäisen GnRH:n ja PGF_{2α}:n väliselle ajalle. 33 vuorokautta ensimmäisen siemennyksen jälkeen aloitetussa protokollassa GnRH ja progesteronia vapauttava emätinkierukka annetaan tutkimuspäivänä. Ne eläimet, joilla ei ole keltarauhasta ja jotka ovat saaneet ensimmäisen GnRH:n 26 vuorokautta siemennyksen jälkeen ilman, että niiden tiineysstatusta on tutkittu, tiputetaan 33-ryhmään, jossa niille aloitetaan progesteronikuuri ja ne saavat uuden GnRH-injektion. Progesteronikuurin avulla saavutetaan näillä keltarauhasettomilla eläimillä samat tiineysluvut kuin sykleivillä eläimillä (Sterry ym. 2006).

4.3 Progesteronin käyttö kiimansynkronoinnissa

Progesteronia voidaan hyödyntää kiimansynkronointiohjelmissa usealla tavalla. Progesteronimäärityksillä maidosta tai verestä voidaan arvioida keltarauhasen toimivuutta. Progesteronilääkitykset puolestaan matkivat luonnollisen keltarauhasen toimintaa.

Stevenson ja Pursley (1994) tutkivat, olisiko maidon progesteronimäärityksestä hyötyä PGF_{2α}:n ajoittamisessa. Eläimiltä mitattiin viikoittain maidosta progesteronipitoisuus, ja mikäli se oli korkea (>1 ng/ml), annettiin PGF_{2α}-injektio. Tällä menettelyllä onnistuttiin mm. lyhentämään aikaa siemennyskauden alusta ensimmäiseen siemennykseen, lyhentämään poikimaväliä sekä vähentämään poistoja tiinehtymättömyyden takia. Maidon progesteronitestaus kannattaa kuitenkin ainoastaan, mikäli se on huomattavasti halvempaa kuin kaksi PGF_{2α}-injektiota.

Hedelmällisyys on parhaimmillaan, kun progesteronipitoisuus on suuri siemennystä edeltävässä diestruksessa tai synkronointiprotokollaa käytettäessä ennen prostaglandiini-injektiota. Parhaimmat tiineystulokset saadaan, kun eläin on viikkoa ennen

PGF_{2α}-injeksiota varhaisessa diestruksessa protokollasta riippumatta (Cartmill ym. 2001).

Niin endo- kuin eksogeeninenkin progesteroni inhiboi kiimaa. Eksogeenista progesteronia voidaan antaa kiiman indusoimiseen injektiona, implanttina, suun kautta tai intravaginaalikerukkana. Eläimiä hoidetaan progesteronilla vähintään normaalin keltarauhasen eliniän ajan. 2–4 päivää progesteronin poistumisen jälkeen alkaa kiima. Keltarauhasen toiminta voidaan lopettaa antamalla luteolyttistä ainetta (PGF_{2α} tai estradioli), jolloin huomattavasti lyhyempi progesteronihoito riittää (Seguin 1997). Pelkkää progesteronia synkronointiin käytettäessä eläimiä pitää hoitaa vähintään 21 vuorokautta, jotta oma keltarauhanen ehtii päästä elinkaarensa loppuun. Progesteronin lisäksi kannattaakin käyttää jotain luteolyttistä ainetta kuten prostaglandiinia tai estrogeenia (Seguin 1997). Progesteronihoito ennen prostaglandiini-injektiota varmistaa sen, että eläimet eivät ole hoitohetkellä kiimakieuron alussa ja niillä on PGF_{2α}:lle reagoiva keltarauhanen (Wishart 1974).

Yhdysvalloissa käytetään Synchro-Mate-B (SMB) -ohjelmaa hiehoille ja lihakarjalle. Siinä eläimille laitetaan norgestomeettia vapauttava implantti korvan taakse ihon alle. Lisäksi annetaan lihaksensisäinen injektio norgestomeettia ja estradiolia. Implantti poistetaan yhdeksän vuorokauden kuluttua, jonka jälkeen siemennetään joko näkyvään kiimaan tai yleisemmin ajoitetusti 48–54 tuntia implantin poiston jälkeen. Tiineysprosentiksi on saatu tarkkailulla 61 % ja ajoitetulla siemennyksellä 55 %. Menetelmä tuottaa samankaltaisia tiineystuloksia kahden PGF_{2α}:n menetelmän kanssa (Seguin 1997).

Hiehoille ja lihakarjalle on Yhdysvalloissa käytössä myös menetelmä, jossa megestroliasetaattia (MGA) syötetään eläimille 14 vuorokautta, jonka jälkeen 16–18 vuorokauden kuluttua injisoidaan prostaglandiinia. Kokonaishoitoaika on 30–32 vuorokautta. Monet eläimet näyttävät kiimaa jo MGA-kuurin lopussa, mutta silti eläimet siemennetään yleensä vasta PGF_{2α}:n jälkeen, jotta synkronisaatio ja fertiliteetti ovat maksimaalisia (Seguin 1997).

4.3.1 Modifioitu Ovsynch

Modifioidussa Ovsynchissä progesteronia sisältävän emätinkierukan annetaan vaikuttaa ensimmäisestä GnRH-injektiosta prostaglandiini-injektioon asti (El-Zarkouny ym. 2004). Stevenson ym. (2006) saivat tiinehtymisen paranemaan hieman verrattuna tavalliseen Ovsynch-protokollaan (56 vuorokautta siemennyksestä tiinehtyneitä 38 % vs. 33 %). Melendez ym. (2006) saivat tiineystuloksiksi progesteronilisällä 31,2 % ja pelkällä Ovsynch-protokollalla 22,7 %. Progesteronikierukalla hoidetuista eläimistä oli suuremmalla osalla 14 vuorokautta siemennyksen jälkeen progesteronipitoisuus yli 1 ng/ml.

Lehmät, joilla munasarjatoiminta ei ole käynnissä ennen hoitoja, hyötyvät eniten progesteronikuurin käytöstä (Stevenson ym. 2006). Ryhmässä, jossa vain 44,1 % sykloi, saatiin progesteronikuurin avulla tiineysprosentiksi 57 vuorokautta siemennyksen jälkeen 45,1 %, kun pelkällä Ovsynchillä synkronoitujen eläinten tiinehtyvyys jäi 19,8 %:iin (El-Zarkouny ym. 2004). Ambrose ym. (2005) saivat modifioidulla Ovsynch-protokollalla hiehoilla 20 prosenttiyksikköä Ovsynchiä tai Heatsynchiä paremman tiinehtyvyyden.

Varhaiset alkiokuolemat ovat yleisimpiä lehmillä, joilla on ollut toimimattomat munasarjat ennen siemennysprotokollan alkua. Progesteronihoito ei vaikuta alkionselviämisprosenttiin (Stevenson ym. 2006). Vastakkaisiakin tuloksia on saatu, sillä El-Zarkouny ym. (2004) saivat progesteronikuurilla parannettua alkionselviämisprosenttia 54,5 %:sta 75,9 %:iin populaatiossa, jossa 44,1 % sykloi ennen protokollan aloitusta. Ryhmässä, jossa sykloivia eläimiä oli 80 %, vastaavaa etua ei saavutettu.

Cavestany ym. (2003) tutkivat medroksiprogesteroniasetaatti (MAP) -kierukan vaikutusta synkronisaatioon. Kierukalla ei todettu olevan vaikutusta eläimen GnRH-vasteeseen. MAP:lla ei myöskään ole todettu vaikutusta dominoivan follikkelin kasvuvauhtiin tai veren estradiolikonsentraatioon GnRH-injektion jälkeen. MAP ei myöskään pystynyt jäljittelemään sellaista fysiologista progesteronitasoa, mikä estäisi ennenaikaisen keltarauhasen surkastumisen ja ovulaation (Cavestany ym. 2003).

4.5 Muita menetelmiä

Rabieen ym. (2005) tekemän meta-analyysin mukaan Ovsynch, Selectsynch, Heatsynch ja Cosynch antavat samankaltaisia tiineystuloksia. Ovsynchin (ja Cosynchin) etuna muihin nähden on se, että voidaan käyttää ajoitettua siemennystä ja voidaan luopua kiimantarkkailusta tiineystuloksista tinkimättä. Cosynchin etu Ovsynchiin nähden on se, että käsittelykertoja tulee yksi vähemmän.

Alnimer (2005) korvasi Ovsynch-protokollan molemmat GnRH-injektiot estradiolibentsoaatilla. Tällä saatiin aikaan samanlainen tiinehtyvyys ensimmäiseen siemennykseen verrattaessa kiimantarkkailua käyttäviin kontrolleihin. Eläimiä siemennettiin, kunnes ne tiinehtyivät, kuitenkin korkeintaan neljä kertaa. Lopullisissa tiineystuloksissa tarvittaessa neljän siemennyksen jälkeen Ovsynch oli tehokkaampi, ja sen avulla myös tyhjäkausi jäi lyhyemmäksi (Ovsynch 76,2 vrk, estradioli 84,7 vrk).

Stevenson ym. (1999) vertasivat erilaisia ajoitettua siemennystä käyttäviä menetelmiä (Ovsynch ja kaksi $\text{PGF}_{2\alpha}$:aa + GnRH) vastaaviin tarkkailuun perustuviin menetelmiin, joissa viimeinen GnRH jätettiin pois, jolloin TAI-menetelmillä saatiin parempia tiineystuloksia.

Stevenson ym. (2000) tutkivat ihon alle asetettavan norgestomeetti-implantin vaikutusta $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektioiden lisänä. Implantti ei parantanut tiineystulosta hiehoilla verrattuna pelkkään $\text{PGF}_{2\alpha}$ -hoitoon. Nuorilla hiehoilla, joiden kiimakierrot eivät olleet vielä alkaneet, norgestomeetti-implantti stimuloi munasarjoja aloittamaan kiimakierrot.

Kaksi $\text{PGF}_{2\alpha}$:aa kiimantarkkailun kera tuottaa Ovsynchin kanssa samanlaiset tiineysprosentit riippumatta poikimakertojen määrästä. Useamman kerran poikineilla eläimillä kahta $\text{PGF}_{2\alpha}$:aa tai Ovsynchiä tehokkaampi menetelmä on kuitenkin presynkronoitu Ovsynch. Kahdella $\text{PGF}_{2\alpha}$:lla saadaan yhtä hyvä tiineystulos Ovsynchin kanssa, kun siihenkin lisätään GnRH 48 tunnin kuluttua viimeisestä $\text{PGF}_{2\alpha}$:sta (Cartmill ym. 2001).

Ambrose ym. (2005) tutkivat modifioidussa Ovsynchissä (Ovsynch lisättynä progesteronikuurilla) GnRH:n korvaamista paitsi ECP:llä, myös sian LH:lla (pLH). PGF_{2α} annettiin progesteronihoidon jatkuttua seitsemän vuorokautta. Progesteronikuuri lopetettiin vuorokauden kuluttua PGF_{2α}:sta. ECP annettiin 24 tuntia PGF_{2α}:n jälkeen, pLH tai GnRH puolestaan 48 tunnin kuluttua PGF_{2α}-injektiosta. 5 mg:n pLH-annos indusoi ovulaation vasta 102 tunnin kuluttua, kun 0,5 mg ECP:tä tai 100 µg GnRH:ta sai sen tapahtumaan jo 64 tunnin päästä progesteronikuurin lopettamisesta. Erittynen LH:n kokonaismäärä oli sama kaikilla hoidoilla. 25 mg pLH:ta sai aikaan GnRH:ta korkeammat LH-konsentraatiot 12–20 tuntia injektion jälkeen. 9–14 päivää injektion jälkeen voitiin 25 mg pLH:ta saaneella ryhmällä mitata korkeampia progesteronipitoisuuksia, mikä kertoi paremmasta keltarauhastoiminnasta.

II Tutkimusosio

GnRH:n ajoituksen merkitys prostaglandiini $F_{2\alpha}$ -injektioon nähden ja lyhyiden syklien esiintyminen

1 Johdanto

Sekä puberteetissa että poikimisen jälkeen ensimmäistä ovulaatiota seuraava kiimakierto on usein normaalisti lyhyt, alle 17 vuorokautta. Emolehmillä vieroituksen jälkeen kiima seuraa noin 10–25 vuorokauden kuluttua, ja monilla tätä seuraava ensimmäinen kiimakierto on tavanomaista lyhyempi (Odde ym. 1980). Hinshelwood ym. (1982) havaitsivat, että lypsävistä holstein-friisiläisistä 13,6 %:lla ja vieroitetuista aberdeen angus -emolehmistä 13,0 %:lla oli ensimmäinen poikimisen jälkeinen kiimakierto lyhyt. Lyhyiden kiertojen keskimääräinen pituus oli holstein-friisiläisillä 12,9 ja aberdeen anguksilla 11,1 vuorokautta. Mahdollisia syitä ensimmäisen poikimisen jälkeisen keltarauhasen heikkouteen ovat luteotropiinin puute, keltarauhas-kudoksen kykenemättömyys vastata luteotropiiniin tai luteolyttisen aineen läsnäolo (Odde ym. 1980).

Kiimansynkronointiohjelmia kehiteltäessä on havaittu, että ovulaation ajoittaminen GnRH-injektiolla pian prostaglandiinilla käynnistetyn luteolyysin jälkeen lisää lyhyiden kiimakiertojen todennäköisyyttä (Taponen ym. 2002). Nämä lyhyet syklit ovat kiimansynkronoinnissa hyvin epätoivottuja, sillä ne estävät tiinehtymisen (Odde ym. 1980). Schmitt ym. (1996) havaitsivat lyhyiden kiimakiertojen vähenevän, kun GnRH ajoitettiin 24 tunnin sijasta 48 tuntia PGF_{2 α} :n jälkeen. PGF_{2 α} -injektion jälkeen ovulaation ajoittamiseksi tarkoitettu GnRH-injektio tulee ajoittaa ennen spontaania LH-piikkiä, jotta ajoitettu siemennys onnistuisi. Liian varhain annettu injektio lisää kuitenkin lyhyiden syklien todennäköisyyttä ja huonontaa täten tiineystulosta. Käytännössä toimiva ajoitus olisi 36–48 tuntia PGF_{2 α} :n jälkeen, sillä vaikka nopeimmat

ovat ehtineetkin jo ovuloida spontaanisti, on vaste suurimmalla osalla hyvä (Peters & Pursley 2003).

Tässä tutkimuksessa selvitettiin, lisääntyvätkö lyhyet kiimakierrot, kun GnRH-injektio annetaan PGF_{2α}-injektion kanssa samanaikaisesti verrattuna siihen, että se annetaan vasta 24 tuntia myöhemmin. Lisäksi selvitettiin, vaikuttaako GnRH-injektion ajankohta progesteronipitoisuuksiin.

2 Aineisto ja menetelmät

2.1 Eläimet

Tutkimus tehtiin Helsingin yliopiston Viikin opetus- ja tutkimustilalla, ja siinä käytettiin 21 hiehoa, joista 19 oli ayrshire- ja 2 holstein-friisiläistä rotua. Hiehot olivat tutkimuksen aloitushetkellä 13–18 kuukauden ikäisiä, ja niiden oli tutkittu sykleivän. Hiehot ruokittiin tilan tavallisilla rehuilla ruokintanormien mukaisesti, ja niitä pidettiin olkikuivitetussa ryhmäkarsinassa. Tutkimukset ajoittuivat tammi-kesäkuulle 2005. Toimenpiteet suoritettiin aina samaan aikaan vuorokaudesta.

2.2 Tutkimusasetelma

Käsittelyjakson alussa hiehojen kiimakierrot synkronoitiin lihaksensisäisellä 0,15 mg:n kerta-annoksella dekskloprostenolia (Genestran[®], 0,075 mg/ml, Vetcare, Salo, Suomi). Prostaglandiini-injektion jälkeen hiehojen munasarjat tutkittiin päivittäin ultraääni-laitteella ovulaation toteamiseksi. Eläimet jaettiin arpomalla kahteen käsittelyryhmään, T0 ja T24, ja seitsemän vuorokauden kuluttua ovulaatiosta ne saivat uuden annoksen dekskloprostenolia. Eläimet saivat myös lihaksensisäisen GnRH-injektion (0,1 mg gonadoreliiniä, Fertagyl[®], Intervet International, Boxmeer, Hollanti) ryhmästä riippuen joko yhtä aikaa PGF_{2α}:n kanssa (T0) tai 24 tuntia sen jälkeen (T24). Prostaglandiini-injektion yhteydessä eläimiltä otettiin verinäyte progesteronimääritystä varten. Näytteenottoa jatkettiin päivittäin aina indusoitua ovulaatiota seuraavaan ovulaatioon

saakka. 24 tuntia GnRH-injektion jälkeen eläinten munasarjat tutkittiin ultraäänen avulla kuuden tunnin välein kunnes ovulaatio havaittiin. Tämän jälkeen munasarjatoimintaa seurattiin ultraäänitutkimuksin päivittäin seuraavaan ovulaatioon saakka. Käsittelyjakson jälkeen koe toistettiin niin, että jokainen hieho osallistui kertaalleen molempiin käsittelyihin. Koejaksojen välillä jokaisella hieholla oli vähintään yksi manipuloimaton kiimakierto.

2.3 Tutkimusmenetelmät

Hiehojen kiimakiertoa ovulaatioineen seurattiin ultraäänitutkimuksin, joissa käytettiin reaaliaikaista ultraäänilaitetta (Aloka SSD-210DXII, Aloka, Japani) ja 7,5 MHz:n rektaalianturia. Kaikki halkaisijaltaan yli 0,5 cm:n follikkelit ja keltarauhanen mitattiin ja kirjattiin ylös. Ovulaatiopäiväksi määritettiin viimeinen tutkimuskerta, jolloin seuraavalla tutkimuskerralla kadonnut suuri follikkeli oli havaittu.

Hiehojen plasman progesteronipitoisuutta analysoitiin päivittäisistä häntäsuonesta otetuista verinäytteistä. Verinäytteet otettiin vakuumilla litium-hepariiniputkiin, ne sentrifugoitiin heti ja pidettiin pakastettuina analysointiin asti. Progesteronipitoisuus määritettiin RIA-menetelmällä käyttäen kaupallista kittiä (Spectria[®], Orion Diagnostica, Orion Oy, Espoo). Havaitsemisraja progesteronille oli 0,3 nmol/l. Progesteronianalyysien sisäinen variaatiokerroin oli 6,9 ja 15,0 % pitoisuuksilla 16,2 ja 33,1 nmol/l, ja analyysien välinen variaatiokerroin vastaavilla pitoisuuksilla oli 10,3 ja 12,3 %.

2.4 Tilastollinen käsittely

Tilastollinen analysointi tehtiin SPSS 13.0 for Windows -ohjelmalla. Erot lyhyiden kiimakiertojen esiintyvyydessä ryhmien T0 ja T24 välillä arvioitiin Fisherin tarkalla nelikenttätestillä. Progesteronipitoisuuden kehitystä ovulaation jälkeen analysoitiin ensimmäisten neljän ja/tai seitsemän päivän ajan ryhmien T0 ja T24 välillä toistettujen mittausten varianssianalyysillä. Tämän lisäksi ryhmä T24 jaettiin kahtia kiimakierron pituuden mukaan (T24s, lyhyt, ja T24n, normaali kiimakierto), ja vastaavat analyysit suoritettiin ryhmien T0, T24s ja T24n välillä. Ovuloituvan follikkelin kokoa analysoitiin

ryhmien T0 ja T24 sekä lyhyiden ja normaalipituisten kiimakiertojen välillä riippumattomien muuttujien t-testillä. Eroavuudet katsottiin merkitseviksi, kun $p < 0,05$.

3 Tulokset

3.1 Reagoimattomuus hormonikäsittelyihin

Tutkimuksessa suoritettiin yhteensä 42 käsittelyjaksoa. Tulosten tarkasteluun hyväksyttiin mukaan ne tapaukset, joissa hieho ovuloi 48 tunnin sisällä GnRH-injektion jälkeen, eli ovulaation voitiin katsoa aiheutuneen hormoni-injektiosta. 12 tapausta poistettiin tuloksista sen vuoksi, ettei ovulaatiota tapahtunut 48 tunnin sisällä GnRH:sta ja kaksi tapausta epätäydellisen luteolyysin takia. Osa poissuljetuista hiehoista ovuloi vasta 3–4 vuorokauden kuluttua GnRH:sta osan aloittaessa uuden follikkeliaallon. Kymmenen kahdestatoista eläimestä, jotka eivät ovuloinneet 48 tunnin sisällä injektioista, kuului ryhmään T0. Ero on merkitsevä ($p < 0,01$).

3.2 Sykliin pituus

Syklin pituudeksi määriteltiin aika, joka kului GnRH:lla indusoidusta ovulaatiosta seuraavaan ovulaatioon. Kaikista tapauksista normaalipituisia (16–21 vuorokautta kestäviä) kiimakiertoja oli 9 ja selvästi lyhyitä (7–8 vuorokautta) 19. Kiimakierron keskimääräinen pituus oli lyhytsyklisillä eläimillä 7,5 vuorokautta ja normaalisyklisillä 18,1 vuorokautta. Lyhyitä syklejä oli siis kaikkiaan 67,9 %:lla eläimistä. Ryhmien välillä havaittiin selviä eroja lyhyiden kiimakiertojen esiintyvyydessä. Ryhmässä T24 niitä oli 47,1 %:lla ja ryhmässä T0 100 %:lla eläimistä. Ero on tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,01$).

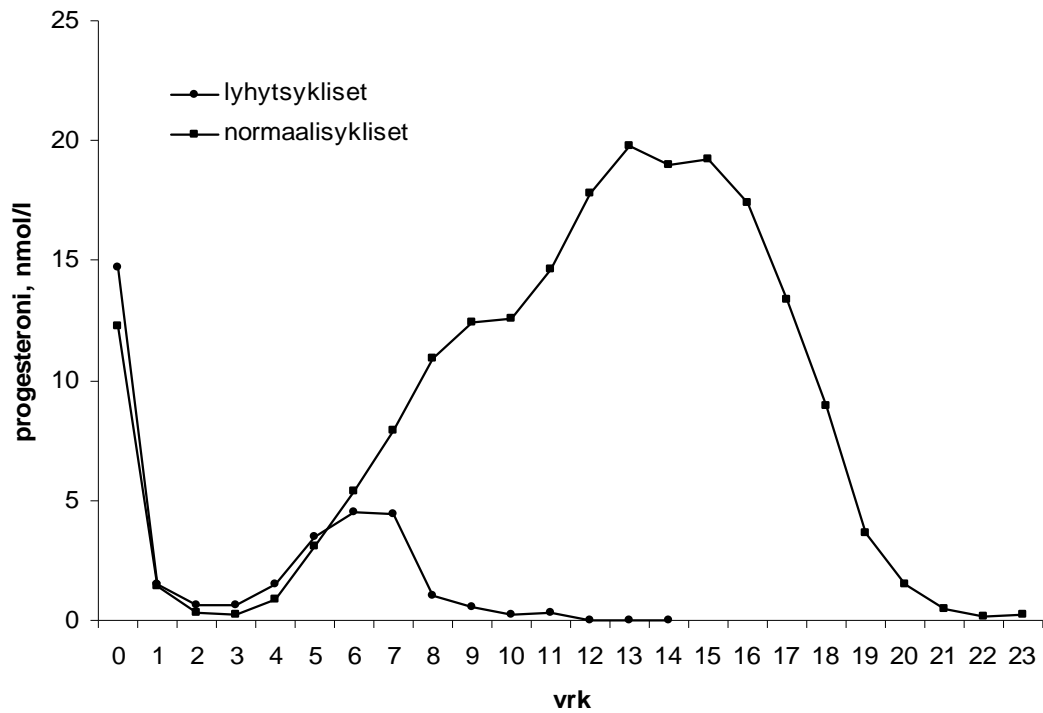
3.3 Ovulaatioajankohta ja follikkelin koko ovulaatiohetkellä

Suurimmassa osassa tapauksia (26/28) ovulaatiohetki ajoittui 24–30 tuntia GnRH-injektion jälkeen, mutta kaksi hiehoa T0-ryhmästä ovuloi vasta 30–47 tunnin kuluttua injektion jälkeen. Ovulatoristen follikkelien kooissa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä PGF_{2α}-, GnRH- tai ovulaatiopäivänä. Ovulatorisen follikkelin keskimääräinen koko kaikilla eläimillä oli ovulaatiopäivänä 13,4±2,0 mm. Ryhmässä T24 follikkeli kasvoi PGF_{2α}:n ja GnRH:n annostelujen välissä keskimäärin 1,7 mm.

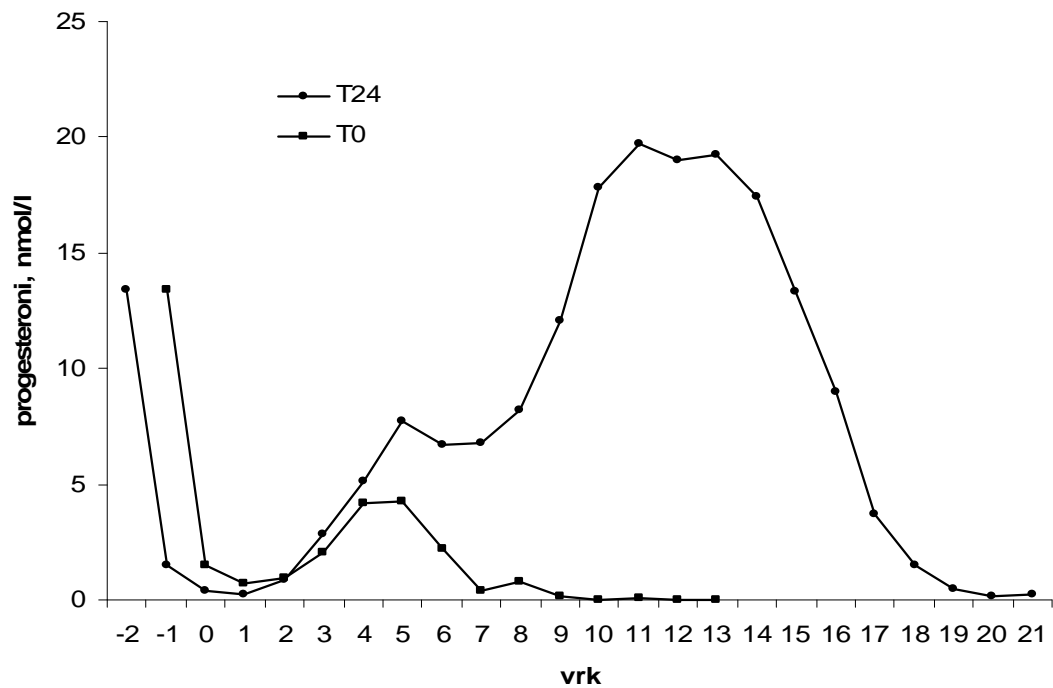
3.4 Progesteronipitoisuudet

Keskimääräinen plasman progesteronipitoisuus sekä ryhmän T0 että ryhmän T24 hiehoilla oli noin 13,9 nmol/l juuri ennen prostaglandiinin annostelua. Lyhytsyklisillä eläimillä oli samankaltaiset pitoisuudet (n. 12,2 nmol/l) normaalisyklisten eläinten (14,7 nmol/l) kanssa. 48 tuntia prostaglandiinin jälkeen 24:llä 25:stä hiehosta oli progesteronitaso pudonnut alle 1 nmol/l:aan. Seurattaessa progesteroniarvojen nousuja seitsemänä vuorokautena ovulaation jälkeen, huomattiin tilastollisesti merkitseviä ($p<0,01$) eroja ryhmien T0 ja T24 sekä lyhytsyklisten ja normaalisyklisten eläinten välillä. Eroja oli sekä progesteronipitoisuuksissa että pitoisuuksien muutoksissa ajan suhteen (kuvat 2 ja 3).

Ero ryhmien välillä ilmeni päivinä 6 ja 7 ovulaation jälkeen. Ryhmän T24n progesteronipitoisuudet olivat merkitsevästi muita ryhmiä korkeammat. Ryhmien T0 ja T24s välillä ei havaittu eroja. Päivinä 1–4 ovulaation jälkeen progesteronipitoisuus nousi samankaltaisesti kaikilla ryhmillä. Ryhmien T0 ja T24s yksittäisillä eläimillä korkein progesteronipitoisuus saavutettiin päivinä 4, 5 tai 6 ovulaation jälkeen.



Kuva 2. Progesteroniarvojen keskiarvojen muutokset PGF_{2α}-injektion jälkeen lyhyt- ja normaalisyklisillä eläimillä.



Kuva 3. Progesteroniarvojen keskiarvojen muutokset suhteessa ovulaatioon ryhmissä T0 ja T24. Päivä 0 on päivä, jolloin ovuloituva follikkeli oli viimeisen kerran havaittavissa.

4 Pohdinta

Tässä tutkimuksessa osoitimme, että kiimansynkronointiohjelmissa käytettyjen $\text{PGF}_{2\alpha}$ - ja GnRH-injektoiden välisen ajan lyhentäminen 24 tunnista 0 tuntiin lisäsi tilastollisesti merkitsevästi lyhyiden kiimakiertojen esiintyvyyttä lypsykarjahiehoilla. Myös 24 tunnin välillä saatiin suuri osuus lyhyitä kiimakiertoja. Tästä voidaan päätellä, että vaikka GnRH:n injisointi yhtäaikaaisesti $\text{PGF}_{2\alpha}$:n kanssa olisi työvoimaa säästävää yhden injektioikerran poistussa, ei se tällaisilla tuloksilla sovellu tiineyttämiseen, sillä eläimet eivät tiinehdy lyhyen syklin ovulaatioon. Myöskään 24 tunnin väli ei näiden tulosten valossa tuota riittävästi normaalipituisia kiimakiertoja.

Lyhytsyklisten eläinten veren progesteronipitoisuus alkoi laskea normaalisyklisiä aiemmin. Myös poikimisen jälkeen esiintyvissä lyhyissä sykleissä progesteronipitoisuus alkaa laskea viidentenä päivänä ovulaation jälkeen, vaikka siihen asti konsentraatiot ovat samankaltaisia normaalien kiimakiertojen kanssa (Copelin ym. 1987). Tämä sopii hyvin siihen tietoon, että lyhytsyklisillä eläimillä on mitattavissa merkittäviä nousuja lyhytsyklisten eläinten 15-ketodihydro- $\text{PGF}_{2\alpha}$ -pitoisuuksissa varhaisen luteaalivaiheen aikana (Taponen ym. 2003), ja keltarauhanen alkaa reagoida prostaglandiiniin elinkaarensa viiden ensimmäisen päivän jälkeen (Seguin 1997).

Useissa kiimansynkronointiohjelmissa käytetään keltarauhasen tuhoamiseksi $\text{PGF}_{2\alpha}$ -injektiota ja ovulaation induktioon GnRH:ta, joka mahdollistaa ajoitetun siemennyksen. Usein GnRH-injektio ajoitetaan 48 tuntia prostaglandiinin jälkeen. Myös aiemmissa tutkimuksissa on havaittu viitteitä siitä, että $\text{PGF}_{2\alpha}$ - ja GnRH-injektoiden välisen ajan lyhentäminen lisäisi lyhyiden kiimakiertojen määrää (Schmitt ym. 1996, Peters ym. 2003, Peters & Pursley 2003). Toisaalta ajan pidentäminen voi johtaa myös epätoivottuun tulokseen, sillä osa eläimistä ehtii ovuloida spontaanisti ennen GnRH-pistosta, jolloin ajoitettu siemennys tapahtuu liian myöhään (Portaluppi & Stevenson 2005). $\text{PGF}_{2\alpha}$ - ja GnRH-injektoiden antaminen yhtäaikaaisesti vähentäisi työvoiman tarvetta verrattuna normaaliin käytäntöön.

Tutkimuksessamme osa hiehoista (12 tapaista, 34,1 %) poistettiin tuloksista sen vuoksi, etteivät ne ovuloineet 24–48 tuntia GnRH:n jälkeen, jolloin ovulaation ei voitu katsoa johtuneen GnRH-pistoksesta. Kymmenen näistä poistetuista tapauksista kuului ryhmään T0. Ero on tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,01$). GnRH-injektion on tarkoitus saada ensimmäisen aallon dominoiva follikkeli ovuloitumaan. Follikkelin pitää olla siis valikoitunut ja riittävän kypsä, jotta se pystyy vastaamaan GnRH:lla indusoituun LH-piikkiin ja ovuloitumaan. Toisaalta injektio on tehoton myös, jos se osuu ensimmäisen aallon jälkeen sille ajanjaksolle, jolloin toisen aallon dominoiva follikkeli ei ole vielä saavuttanut dominanssiaan. Tutkimuksessamme GnRH-pistos ajoittuu 7 tai 8 vuorokautta ensimmäisen jälkeen, jolloin follikkeliaallon pitäisi olla 7 tai 8 vuorokautta vanha. Ensimmäisen aallon dominoiva follikkeli saavuttaa dominanssinsa kolme päivää ovulaation jälkeen ja on läsnä päivään 10 asti, jolloin alkaa toinen follikkeliaalto. Selkeää yhteyttä follikkeliaaltojen määrän ja iän tai rodun kanssa ei ole (Driancourt 2001). Kiimakierron päivinä 7–8 hiehoilla pitäisi siis olla GnRH:iin vastaava ensimmäisen aallon dominoiva follikkeli munasarjoissaan suurella varmuudella. Tutkimuksessamme etenkin ryhmällä T0 esiintynyt huono vaste GnRH-injektioon johtuneekin muista tekijöistä.

Kiitokset

Kiitän ohjaajiani Juhani Taposta ja Mari Rantalaa kärsivällisestä ja perusteellisesta ohjaustyöstä. Lisäksi tahdon kiittää Viikin opetus- ja tutkimustilan henkilökuntaa saamastani avusta.

KIRJALLISUUS

Alnimer MA. Comparison of an oestrus synchronisation protocol with oestradiol benzoate and PGF_{2α} at detected oestrus to a timed insemination protocol (Ovsynch) on reproductive performance of lactating dairy cows. *Reprod Nutr Dev* 2005, 45: 699–708 (Abst.)

Ambrose JD, Kastelic JP, Rajamahendran R, Aali M, Dinn N. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: Ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. *Theriogenology* 2005, 64: 1457–1474

Archbald LF, Tran T, Massey R, Klapstein E. Conception rates in dairy cows after timed-insemination and simultaneous treatment with gonadotrophin releasing hormone and/or prostaglandin F2 alpha. *Theriogenology* 1992, 37: 723–731

Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 6.p. Ballière Tindall, London, 1989: 6-7

Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2006, 89: 3413-3424

Burke JM, De la Sota RL, Risco CA, Staples CR, Schmitt ÉJ-P, Thatcher WW. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasin hormone agonist in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1996, 79: 1385–1393

Cartmill JA, El-Zarkouny SZ, Hensley BA, Lamb GC, Stevenson JS. Stage of Cycle, Incidence, and Timing of Ovulation, and Pregnancy Rates in Dairy Cattle after Three Timed Breeding Protocols. *J Dairy Sci* 2001, 84: 1051–1059

Cavestany D, Meikle A, Kindahl H, Van Lier E, Moreira F, Thatcher WW, Forsberg M. Use of medroxyprogesterone acetate (MAP) in lactating Holstein cows within an Ovsynch protocol: follicular growth and hormonal patterns. *Theriogenology* 2003, 59: 1787–1798

Chebel RC, Santos JEP, Reynolds JP, Cerri RLA, Juchem SO, Overton M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004, 84: 239–255

Chebel RC, Santos JE, Cerri RL, Rutigliano HM, Bruno RG. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *J Dairy Sci* 2006, 89: 4205-4219

Cooper MJ. Control of oestrus cycles of heifers with a synthetic prostaglandin analogue. *Vet Rec* 1974, 95: 200–203

Copelin JP, Smith MF, Gaverick HA, Youngquist RS. Effect of the uterus on subnormal luteal function in anestrus beef cows. *J Anim Sci* 1987, 64: 1506-1511

Cordoba MC, Fricke PM. Evaluation of Two Hormonal Protocols for Synchronization of Ovulation and Timed Artificial Insemination in Dairy Cows Managed in Grazing-Based Dairies. *J Dairy Sci* 2001, 84: 2700–2708

Cordoba MC, Fricke PM. Initiation of the Breeding Season in a Grazing-Based Dairy by Synchronization of Ovulation. *J Dairy Sci* 2002, 85: 1752–1763

Dobson H, Cooper MJ, Furr BJA. Synchronization of oestrus with I.C.I. 79,939, an analogue of PGF_{2α}, and associated changes in plasma progesterone, oestradiol – 17β and LH in heifers. *J Reprod Fert* 1975, 42: 141–144

Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 2001, 55: 1211-1239

El-Zarkouny SZ, Cartmill JA, Hensley BA, Stevenson JS. Pregnancy in Dairy Cows After Synchronized Ovulation Regimens With or Without Presynchronization and Progesterone. *J Dairy Sci* 2004, 87: 1024–1037

Fricke PM, Caraviello DZ, Weigel KA, Welle ML. Fertility of Dairy Cows after Resynchronization of Ovulation at Three Intervals Following First Timed Insemination. *J Dairy Sci* 2003, 86: 3941–3950

Gümen A, Guenther JN, Wiltbank MC. Follicular Size and Response to Ovsynch Versus Detection of Estrus in Anovular and Ovular Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 2003, 86: 3184–3194

Hafs HD. Ovulation control and release of hormones with prostaglandin F_{2a} in cattle. VIIIth International congress of animal reproduction and artificial insemination, Krakova, 1976, 17 – 27

Hafs HD, Louis TM, Noden PA, Oxender WD. Control of the estrus cycle with Prostaglandin F_{2α} in cattle and horses. *J Anim Sci* 1974, 38 (Suppl.): 10–21

Hinshelwood MM, Hansen PJ, Hauser ER. Short estrus cycles in postpartum cows as influenced by level of milk production, suckling, diet, season of calving and interval to first estrus. *Theriogenology* 1982, 18: 383-392

Kasimanickam R, Cornwell JM, Nebel RL. Fertility following fixed-time AI or insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2005, 63: 2550–2559

Keister ZO, DeNise SK, Armstrong DV, Ax RL, Brown MD. Pregnancy outcomes in two commercial dairy herds following hormonal scheduling programs. *Theriogenology* 1999, 51: 1587–1596

Larson LL, Ball PJH. Regulation of estrus cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology* 1992, 38: 255–267

LeBlanc SJ, Leslie, KE. Presynchronization Using a Single Injection of PGF2a Before Synchronized Ovulation and First Timed Artificial Insemination In Dairy Cows. *J Dairy Sci* 2003, 86: 3215–3217

Lee CN, Maurice E, Ax RL, Pennington JA, Hoffman WF, Brown MD. Efficacy of gonadotropin-releasing hormone administered at the time of artificial insemination of heifers and postpartum and repeat breeder dairy cows. *Am J Vet Res* 1983, 44: 2160–2163

Looper ML, Lents CA, Wetteman RP. Body condition at parturition and postpartum weight changes do not influence the incidence of short-lived corpora lutea in postpartum beef cows. *J Anim Sci* 2003, 81: 2390-2394

Louis TM, Hafs HD, Seguin BE. Progesterone, LH, Estrus and Ovulation after Prostaglandin F2a in Heifers. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973, 143: 152–155

Lucy MC, Stevenson JS, Call EP. Controlling First Service and Calving Interval by Prostaglandin F2a, Gonadotropin-Releasing Hormone, and Timed Insemination. *J Dairy Sci* 1986, 69: 2186-2194

Melendez P, Gonzales G, Aguilar E, Loera O, Risco C, Archbald LF. Comparison of Two Estrus-Synchronization Protocols and Timed Artificial Insemination in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 2006, 89: 4567–4572

Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of Presynchronization and Bovine Somatotropin on Pregnancy Rates to a Timed Artificial Insemination Protocol in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 2001, 84: 1646–1659

Navanukraw C, Redmer DA, Reynolds LP, Kirsch JD, Grazul-Bilska AT, Fricke PM. A Modified Presynchronization Protocol Improves Fertility to Timed Artificial Insemination in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 2004, 87: 1551–1557

Odde KG, Ward HS, Kiracofe GH, McKee RM, Kittok RJ. Short estrous cycles and associated serum progesterone levels in beef cows. *Theriogenology* 1980, 14: 105-112

Oxender WD, Noden PA, Louis TM, Hafs HD. A Review of Prostaglandin F_{2α} for Ovulation Control in Cows and Mares. *Am J Vet Res* 1974, 35: 997–1001

Pancarci SM, Jordan ER, Risco CA, Schouten MJ, Lopes FL, Moreira F, Thatcher WW. Use of Estradiol Cypionate in a Presynchronized Timed Artificial Insemination Program for Lactating Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 2002, 85: 122–131

Peters MW, Pursley JR. Fertility of Lactating Dairy Cows Treated with Ovsynch after Presynchronization Injections of PGF_{2α} and GnRH. *J Dairy Sci* 2002, 85: 2403–2406

Peters MW, Pursley JR. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology* 2003, 60: 1197-1204

Portaluppi MA, Stevenson JS. Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the Ovsynch protocol. *J Dairy Sci* 2005, 88: 914-921

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology* 1995, 44: 915-923

Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Gaverick HA, Anderson LL. Pregnancy Rates Per Artificial Insemination for Cows and Heifers Inseminated at a Synchronized Ovulation or Synchronized Estrus. *J Dairy Sci* 1997, 80: 295-300

Rabiee AR, Lean IJ, Stevenson MA. Efficacy of Ovsynch Program on Reproductive Performance in Dairy Cattle: A Meta-Analysis. *J Dairy Sci* 2005, 88: 2754–2770

Schmitt, ÉJ-P, Diaz, T, Drost M, Thatcher WW. Use of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist of Human Chorionic Gonadotropin for Timed Insemination in Cattle. *J Anim Sci* 1996, 74: 1084–1091

Seguin B. Strategies for estrus control to improve dairy reproductive performance. Soc. for Theriogenology, Proc. for Annual Meeting, Sept. 17-20, 1997, p. 320–331

Senger PL. The Estrus Detection Problem: New Concepts, Technologies, and Possibilities. J Dairy Sci 1994, 77: 2745–2753

Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition, USA, 2.p. 2003: 164–213

Stellflug JN, Louis TM, Hafs HD, Seguin BE. Luteolysis, Estrus and Ovulation, and Blood Prostaglandin F after intramuscular administration of 15, 30 or 60 mg Prostaglandin F_{2α}. Prostaglandins 1975, 9: 609–615

Sterry RA, Welle ML, Fricke PM. Effect of Interval from Timed Artificial Insemination to Initiation of Resynchronization of Ovulation on Fertility of Lactating Dairy Cows. J Dairy Sci 2006, 89: 2099–2109

Stevenson JS, Pursley JR. Use of Milk Progesterone and Prostaglandin F_{2α} In a Scheduled Artificial Insemination Program. J Dairy Sci 1994, 77: 1755–1760

Stevenson JS, Lucy MC, Call EP. Failure of Timed Inseminations and Associated Luteal Function in Dairy Cattle After two Injections of Prostaglandin F_{2α}. Theriogenology 1987, 28: 937-946

Stevenson JS, Kobayashi Y, Shipka MP, Raucholz KC. Altering Conception of Dairy Cattle by Gonadotropin-Releasing Hormone Preceding Luteolysis Induced by Prostaglandin F_{2α}. J Dairy Sci 1996, 79: 402–410

Stevenson JS, Kobayashi Y, Thompson KE. Reproductive Performance of Dairy Cows in Various Programmed Breeding Systems Including OvSynch and Combinations of Gonadotropin-Releasing Hormone and Prostaglandin F_{2α}. J Dairy Sci 1999, 82: 506–515

Stevenson JS, Smith JF, Hawkins DE. Reproductive Outcomes for Dairy Heifers Treated with Combinations of prostaglandin $F_{2\alpha}$, Norgestomet, and Gonadotropin-Releasing Hormone. *J Dairy Sci* 2000, 83: 2008–2015

Stevenson JS, Tiffany SM, Lucy MC. Use of Estradiol Cypionate as a Substitute for GnRH in Protocols for Synchronizing Ovulation in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 2004, 87: 3298–3305

Stevenson JS, Pursley JR, Garverick HA, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS, Wiltbank MC. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J Dairy Sci* 2006, 89: 2567-2578

Taponen J, Kulcsár M, Kátai L, Huszenicza G, Rodríguez-Martínez H, Katila T. Short estrous cycles and estrous signs after premature ovulations induced with cloprostenol and gonadotropin-releasing hormone in cyclic dairy cows. *Theriogenology* 2002, 58: 1291-1302

Taponen J, Hjerpe P, Kopra E, Rodríguez-Martínez H, Katila T, Kindahl, H. Premature prostaglandin $F_{2\alpha}$ secretion causes luteal regression in GnRH-induced short estrous cycles in cyclic dairy heifers. *Theriogenology* 2003, 60: 379-393

Tenhagen B-A, Drillich M, Surholt R, Heuwieser W. Comparison of Timed AI After Synchronized Ovulation to AI at Estrus: Reproductive and Economic Considerations. *J Dairy Sci* 2004, 87: 85–94

Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 1989, 31: 149–164

Thatcher WW, Drost M, Savio JD, Macmillan KL, Entwistle KW, Schmitt EJ, De la Sota RL, Morris GR. New Clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim Reprod Sci* 1993, 33: 27–49

Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx J, Villeneuve P, Dufour JJ. Influence of an Agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on Estrus Synchronization and Fertility in Beef Cows. *J Anim Sci* 1992a, 70: 1904–1910

Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx J, Dufour, JJ. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. *Theriogenology* 1992b, 38: 1131–1144

Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrus cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999, 52: 1067–1078

Wishart DF. Synchronisation of Oestrus in Cattle Using a Potent Progestin (SC21009) and PGF_{2a}. *Theriogenology* 1974, 1: 87–90